

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas
de quitosano, para su aplicación como biomaterial**

TESIS

para optar el título profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Erick Victor Espinoza Espíritu

Lima - Perú

2007

A mis padres

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme salud, paciencia y la oportunidad de conocer a personas maravillosas.

A la MSc. Ana Pastor de Abram, consultora externa de mi tesis, quien me ha guiado con sus conocimientos, consejos, disponibilidad, calidad humana, su confianza y visión de para promover investigación.

En especial a la MSc. Lina Belén Fuentes Yalli, por su invaluable ayuda, alegría y gran optimismo en la obtención del quitosano y la caracterización del mismo.

En especial a MSc. Nino Castro, por su ayuda en la obtención del quitosano y la caracterización del mismo.

Al profesor PhD. MSc. Carlos Peniche del Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana, por su disponibilidad para responder mis dudas y por sus comentarios, en la evaluación de las esponjas.

Al profesor PhD. MSc. Cristián Tapia de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por permitirme realizar las pruebas mecánicas de las esponjas de quitosano.

Al profesor PhD. MSc. Juan Rueda, por haberme facilitado las instalaciones del Laboratorio de Polímeros en la Sección Física de la Facultad Ciencias e Ingeniería de la PUCP.

A Karina que gracias a su dinamismo y buen trato se hicieron coordinaciones con instituciones para la celeridad de este trabajo.

Y a mis amigos, por sus valiosos consejos, apoyo y constancia.

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Tabla de contenidos	iii
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Índice de ecuaciones	vii
Índice de anexos	viii
Abreviaturas y simbología	ix
Relación de instrumentos utilizados	x
 I INTRODUCCIÓN.....	 1
 II MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes.....	2
2.2. Bases teóricas	
2.2.1 Biopolímeros de origen natural.....	8
2.2.2 Quitosano.....	9
2.2.3 Usos y aplicaciones del quitosano.....	10
2.2.4 Caracterización del quitosano.....	14
2.2.5 Soluciones de quitosano.....	16
2.2.6 Propiedades del quitosano.....	17
2.2.7 Esponjas de quitosano.....	24
2.2.8 Evaluación de las esponjas de quitosano.....	25
2.3 Planteamiento del problema.....	30
2.4 Justificación.....	30
2.5 Objetivos.....	30
2.6 Hipótesis.....	31

III	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	Tipo de estudio.....	32
3.2	Población y muestra.....	32
3.3	Operacionalización de variables.....	33
3.4.	Materiales.....	34
3.5.	Preparación de las esponjas de quitosano.....	34
3.6	Neutralización de las esponjas de quitosano.....	35
3.7.	Preparación de hidrogeles.....	35
3.8	Preparación de muestras de ensayo.....	35
3.9	Evaluación de las esponjas de quitosano.....	36
3.10.	Análisis estadístico de datos.....	40
IV	RESULTADOS Y	
4.1.	Esponjas de quitosano.....	42
4.2.	Evaluación de esponjas de quitosano de quitosano.....	35
4.2.1	Pruebas mecánicas.....	43
4.2.2	Determinación del tamaño de poro y porosidad.....	45
4.2.3	Determinación del grado de hinchamiento.....	46
4.2.4	Prueba de biocompatibilidad.....	48
V	DISCUSIÓN.....	50
VI	CONCLUSIONES.....	53
VII	RECOMENDACIONES.....	54
VIII	BIBLIOGRAFÍA.....	55
IX	ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
2.1	Características Generales de algunos polímeros	8
2.2	Roles biológicos del quitosano aplicados a tejidos humanos	11
2.3	Formas físicas de derivados de quitina y sus aplicaciones biomédicas	11
2.4	Tipos de test biológicos utilizados en los estudios de biocompatibilidad de los materiales	29
3.1	Descripción de las películas acondicionadas para los ensayos	36
4.1	Mediciones del pH de las esponjas de quitosano	42
4.2	Mediciones del espesor (en mm) de las esponjas de quitosano	42
4.3	Resultados de las pruebas mecánicas realizadas a las diferentes esponjas	43
4.4	Resultados del análisis microscópico de las diferentes esponjas	45
4.5	Resultado de la prueba de hinchamiento realizada a las esponjas entrecruzadas	46
4.6	Resultado de la prueba de hinchamiento realizada a las esponjas no entrecruzadas	46
4.7	Resultados de la prueba de biocompatibilidad 7 días	48
4.8	Resultados de la prueba de biocompatibilidad 21 días	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
2.1	Unidades repetidas de quitosano	9
2.2	Proceso de obtención de quitosano	14
3.1	Diagrama de los ensayos mecánicos realizados a las esponjas	36
3.2	Diagrama del gráfico carga vs. extensión	37
4.1	Alargamiento porcentual (A%) de las esponjas	44
4.2	Esfuerzo de tracción en el corte de las esponjas	44
4.3	Curva de hinchamiento de ambas esponjas de quitosano	47

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación	Descripción	Página
1	Determinación del esfuerzo de tracción en el corte (ETC)	37
2	Determinación del área transversal inicial de la esponja	37
3	Determinación del alargamiento porcentual (A%)	38
4	Determinación de la porosidad	38
5	Determinación del hinchamiento	39
6	Determinación del coeficiente de variación (CV)	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Descripción	Página
1	Esquema del analizador de textura	64
2	Especificaciones del analizador de textura	65
3	Microestructura de las esponjas de quitosano	66
4	Hoja de recolección de datos de la prueba de biocompatibilidad	67
5	Lectura y microfotografías histológicas de la prueba de biocompatibilidad	68

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Símbolo	Descripción
A%	Alargamiento porcentual
Å	Amstrong
ASTM	American Society for Testing and Materials
CV	Coefficiente de variación
E	Entrecruzada
EE	Esponja entrecruzada
ENE	Esponja no entrecruzada
ETC	Esfuerzo de tracción en el corte
GD	Grado de N-deacetilación
GAG	Glucosaminoglicano
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HR	Humedad Relativa
ISO	International Standard Organization
Mpa	Megapascal
N	Newton
n	Número de muestras ensayadas
PM	Peso Molecular
PBS	Solución buffer de fosfato
H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SEM	Scanning Electronic Microscopy
S/E	Sin entrecruzar
TCP	Fosfato tricalcico
UV	Ultravioleta

RELACIÓN DE INSTRUMENTOS Y SOFTWARES UTILIZADOS

INSTRUMENTO	DESCRIPCIÓN
Microscopio Electrónico de Barrido	
Software de análisis de Imágenes para microscopía	NIH software image
Analizador de textura	Lloyd, Modelo LR5K, Inglaterra
Software de control del analizador de textura	DAPMAT, V3.05, EE.UU
Balanza electrónica	Chyo, Modelo MJ-300, Japón
Acondicionador de aire	York, Modelo MCH12PM, EE.UU.
Deshumidificador	Humidex Modelo 4, EE.UU
Estufa	GCA corporation
Agitador magnético	Thermolyne NUOVA II
pHmetro	Hanna Instruments HI 8417
Micrómetro digital	Cole Parmer Fowler
Varianza t de student (software origin)	versión 7.5, EE.UU.

I. INTRODUCCION

El quitosano es un biopolímero natural catiónico derivado por deacetilación de quitina poli $[\beta-(1-4)-2 \text{ acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos}]$, la cual se obtiene principalmente por métodos químicos de los exoesqueletos de crustáceos y de la concha caliza (pluma) de moluscos. El quitosano contiene un gran número de grupos hidroxilo y amino, los cuales le dan la posibilidad de interactuar con otros grupos bioactivos.

La ciencia de los biomateriales ha tenido un ascendente desarrollo, esto es factible gracias a la disponibilidad de materiales metálicos, cerámicos, composites y poliméricos, que van a permitir la fabricación de biomateriales avanzados para tejidos duros como blandos, bioestables o biodegradables con una relación cada día mas extensa y específica de dispositivos biomédicos que van desde marcapasos hasta prótesis de rodillas, toda una serie de soportes para regeneración de tejidos, incluyendo sistemas biodegradables utilizados como suturas temporales con reabsorción espontánea en un intervalo de tiempo apropiado, o los sistemas de liberación controladas de medicamentos y compuestos bioactivos que ofrecen enormes posibilidades de desarrollo en un futuro próximo.

Actualmente en los Laboratorios de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, se ha desarrollado tecnología hasta el nivel piloto para la producción de quitosano. Al momento, es de interés desarrollar aplicaciones de estos productos, transformándolos según su uso y dando un significativo valor agregado a los mismos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

1. Seon Cho, Ran Hong, Moo Lee (1999), desarrollaron una esponja reabsorbible para curación de heridas conteniendo sulfadiazida de plata, caracterizada por una prueba de retención de agua, liberación de droga *in vitro* y una prueba de degradación de colagenasa. La esponja cargada con sulfadiazida de plata liberó la droga lentamente por encima de 4 días. La prueba *in vivo* en ratas presentó un efecto de curación de herida bastante bueno.¹
2. Sundararajan, Howard (1999) En este estudio examinaron el uso de quitosano para la formación de andamiajes porosos de microestructura controlada. Los materiales fueron caracterizados vía microscopia electrónica. Los andamiajes formados incluyeron membranas, bloques, tubos y granos porosos. Los diámetros del poro podían ser controlados dentro de la gama 1-250 μm , variando las condiciones de congelación.²
3. Caren C. Leffer, Bernd W. (2000), investigaron la influencia del tipo de ácido usado para disolver quitosano sobre el resultado de las propiedades físicas de la esponja y otros efectos consecuentes sobre la liberación de drogas. Se concluyó que es posible manipular las propiedades mecánicas y de liberación de droga usando diferentes ácidos para disolver quitosano.³
4. Tanveer A. Khan, Kok K. Peh (2000), investigaron las propiedades mecánicas, fuerza de adhesión *in vitro* del quitosano-Acido Acético (AA), quitosano- Acido Láctico (LA) y Omniderm. Las películas de quitosano demostraron significativas diferencias en las propiedades mecánicas y fuerza de bioadhesión. Quitosano – LA resultó mas suave, flexible y bioadhesivo cuando es comparado con películas de quitosano. Además, quitosano-LA no causó eritema, edema ni toxicidad sistémica.⁴

5. Fwu L. Mi, Shin S. Shyu (2001), La membrana de quitosano presentó pérdida de agua controlada, excelente permeabilidad al oxígeno y habilidad de drenaje de fluidos, inhibición de la invasión de microorganismos exógenos debido a la densa capa de piel y propiedades antimicrobiales inherentes del quitosano. Los resultados de este estudio indican que la membrana de quitosano, puede ser adecuadamente empleada en el futuro como apósito de heridas.⁵
6. Claire Chatelet, Odile Damour (2001), el rol del grado de acetilación (GA) sobre algunas propiedades biológicas de películas de quitosano es importante ya que el elevado GA de quitosano disminuye la adhesión y el crecimiento de las células sobre las películas. En conclusión, el GA juega un papel clave en la adhesión y proliferación celular, pero no hay cambios en la citocompatibilidad del quitosano. En paralelo, esto también es importante para advertir el rol jugado por la morfología superficial del material, el segundo mayor importante parámetro de influencia del mecanismo de adhesión.⁶
7. Jianbiao Ma, Hong Wang (2001), este estudio evaluó películas y esponjas de quitosano como andamiaje para ingeniería tisular en piel y dermis. Los fibroblastos dérmicos humanos fueron sembrados en la esponja de quitosano y cultivados por 4 semanas. Se encontró que las células crecieron y proliferaron.⁷
8. Pierre Sorlier, Anne Venuziere (2001), este trabajo realizó un estudio de las variaciones del pH sobre quitosanos con iguales GD. Los resultados permiten una mejor comprensión de algunas características fisicoquímicas y biológicas de quitosano y de quitina.⁸
9. H. Ueno, T. Mori, F. Toro (2001), esta revisión presenta una visión sobre los usos actuales de quitosano en curaciones de heridas, y algunos efectos sobre algunos grupos celulares encargados de la respuesta inflamatoria y de la cicatrización.⁹

10. ASTM: F 2103-01, esta norma guía e identifica los parámetros claves, relevantes para la funcionalidad y caracterización de quitosano para el desarrollo de nuevas aplicaciones comerciales de quitosano en la industria biomédica y farmacéutica.¹⁰
11. Hoffman Allan (2002), este artículo repasa la composición y la síntesis de los hidrogeles, el carácter de su absorción de agua, y de la impregnación de solutos dentro de sus matrices hinchadas. Las propiedades más importantes de los hidrogeles son sus usos biomédicos, especialmente para su uso como portadores de droga y de células así como matrices para la ingeniería del tejido.¹¹
12. Taek W. Chung, Jun Yang (2002), este estudio presenta un quitosano funcionalizado para la fabricación de andamiajes y su evaluación en la adherencia de hepatocitos. La porosidad y tamaño de poro de la esponja fue dependiente del peso molecular del Quitosano Galactosilado y de la temperatura de congelación.¹²
13. Ehrenfreund-Kleinman, Z. Gazit (2002), se investigó la síntesis de esponjas basadas en un polisacárido para el uso de ingeniería tisular. Las esponjas obtenidas fueron altamente porosas, rápidamente hinchadas en agua y estables in vitro por lo menos por 11 semanas en medio acuoso a 37° C. La esponja Arabinogalactam (AG)/Quitosano fue elegida la más adecuada como andamiaje para el crecimiento celular después de la técnica de implantación en ratones.¹³
14. Trong-Ming, Chung Yang (2002), se estudió la conducta degradativa de copolímeros de quitosano. El comportamiento de los copolímeros fue observado entre una solución de lisozimas y una solución buffer. La degradación promedio fue alta con la solución de lisozimas.
15. Jin Shu Mao, Hai Feng (2003), el objetivo de este estudio fue investigar las propiedades de membranas de gelatina/quitosano que fueron modificados con la incorporación de ácido hialurónico. Con la incorporación de este ácido mejoraron

la flexibilidad y la adhesión de fibroblastos, mientras bajaba el promedio de biodegradación del andamiaje.¹⁵

16. Hui Ling, Asad Abu'Khalil (2003), en este estudio se prepararon esponjas a base de alginato y quitosano con el fin de usarlos como apósito de heridas y como matrices para ingeniería celular. Se notó que la esponja tiene una flexibilidad y textura marcada fijada microscópicamente. Estudios en SEM indicaron que el sistema mezclado tiene una menor microestructura definida que las esponjas de componente único. Los estudios de disolución indicaron que los sistemas conteniendo solo quitosano presentan bajo perfil de liberación, con un sistema mezclado, presentaron un perfil rápido de liberación. El uso de quitosano y alginato juntos, por lo tanto, permite al formulador, manipular ambas propiedades mecánicas y de liberación de drogas de la esponja.¹⁶
17. Tanveer Ahmad, Kok Khiang (2003), se evaluó dos películas de quitosano (quitosano Acido Acético (AA) y Quitosano Acido Láctico (LA)), Las películas fueron evaluadas en términos de transparencia, flexibilidad, propiedad de adherencia, facilidad de remoción de heridas sin que perjudicasen el tejido debajo de la película. Los resultados mostraron que ambas películas Chitosan AA y Chitosan LA fueron capaces de promover la curación de herida con mínima formación de escara.¹⁷
18. Sevda Senel, Susan Mc Clure (2004), este artículo revisa aplicaciones veterinarias actuales para quitosano, incluyendo curación de herida regeneración de hueso, analgesia y efecto antimicrobiano. También es analizado el potencial uso en liberación de fármacos y vacunas.¹⁸
19. J. Berger, M Rieist, J Mayer (2004), este artículo revisa un análisis crítico de entrecruzamiento iónico y covalente en hidrogeles de quitosano y redes relacionadas para aplicaciones médicas o farmacéuticas. Los hidrogeles con entrecruzamiento iónico son considerados biocompatibles y bien tolerados. El

entrecruzamiento iónico de hidrogeles los expone a un alto hinchamiento sensible a los cambios de pH comparado con hidrogeles de entrecruzamiento covalente.¹⁹

20. Nagwa Foda, Hanan El-Iathy (2004), desarrollaron esponjas de quitosano entrecruzadas como sistemas de liberación de drogas optimizando el proceso. Se evaluó propiedades mecánicas, superficie, tamaño de poro y liberación de droga.²⁰
21. A. Babu, R. Panchagula (2004), se desarrollo películas de quitosano para liberaron de paclitaxel. Estas películas liberaron sólo 10% a 15% de la droga cargada. La biocompatibilidad se reveló por estudios histológicos. La falta de respuesta inflamatoria inducida por la formulación de películas de quitosano cargadas con paclitaxel sugiere un paradigma nuevo para la quimioterapia localizada basada en sistemas capaces de ser implantados.²¹
22. Shan-Hui Hsu, Shu Wen (2004), en este estudio se investigó in vitro el papel del grado de desacetilación y peso molecular en algunas características biológicas de películas de quitosano. Los resultados demostraron que el grado de desacetilación afectó la hidrofiliidad y biocompatibilidad de las películas de quitosano. El peso molecular, por otra parte, afectó el índice de degradación y las características mecánicas.²²
23. S. Vasiliu, M. Popa, M. Rinaudo (2005), en este estudio fue investigado la influencia de las condiciones experimentales en la obtención de cápsulas. Dos métodos de simple coacervación fueron usados para obtener cápsulas esféricas. La espectroscopia de H-NMR confirmó una formación compleja del polielectrolito y la microscopia óptica presentó que las cápsulas tienen buena esfericidad.²³
24. Karageorgiou, D. Kaplan (2005), esta revisión explora el conocimiento de la relación entre la porosidad y el tamaño de poro de biomateriales usados en regeneración ósea.²⁴

25. Thomas Freier, Hui Shan Koh (2005), Se desarrollaron películas a base de quitosano; se les realizó pruebas de biodegradación compatibilidad y adhesión celular. Todos las películas de quitosano presentaron adhesión celular después de 2 días de cultivo, sin embargo la viabilidad celular decreció con el aumento de la acetilación. Así el contenido de amina del quitosano puede ser controlado para optimizar la biodegradación y compatibilidad celular.²⁵
26. Iyabo Adekogbe, Amyl Ghanem (2005), en este estudio se preparó andamiajes entrecruzados a diferentes grados de desacetilación. La biodegradación promedio de los andamiajes entrecruzados con glutaraldehído fue disminuido, mientras un efecto no significativo fue observado en la biodegradación de unas muestras de quitosano con 100% de desacetilación entrecruzadas o no entrecruzadas después de 24 días de degradación.²⁶
27. Yan Huang, Stella Onyeri, Sundararajan (2005), en este estudio se evaluó la degradación de andamiajes de quitosano y quitosano/gelatina en presencia de 10 mg/L de lisozima por un periodo de 2 meses. En resumen estos resultados presentaron una influencia significativa de la mezcla de quitosano sobre las propiedades del andamiaje y comportamiento celular.²⁷
28. Wenling Cao, Mingyu, Cheng (2005), en este estudio se preparó tres tipos de films y entrecruzado con hexametileno diisocianato, epiclohidrin y glutaraldehído. Las propiedades mecánicas, biodegradabilidad y afinidad a células de Schwann fueron evaluadas. Estos resultados sugieren que el film de quitosano entrecruzado con hexametileno diisocianato posee una combinación de propiedades mecánica biodegradabilidad y afinidad celular apropiada para regeneración de nervios.²⁸

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Biopolímeros de Origen Natural

Los biomateriales brindan la ventaja de ser estructuras similares a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer y metabolizar; y así evitamos el problema de toxicidad y de respuesta inflamatoria.

Una característica particular de los polímeros naturales (tabla 2.1) es su habilidad de ser degradados por enzimas que se encuentran en el organismo vivo, esta es garantía de que el implante será degradado y metabolizado por mecanismos fisiológicos. Esta propiedad se emplea en caso de aplicaciones temporales en las cuales se requiere el cumplimiento de una función específica en un periodo de tiempo determinado. La velocidad de degradación de los materiales implantados puede controlarse mediante modificaciones químicas o entrecruzamiento del biopolímero, permitiendo el diseño con determinado grado de duración.²⁹

Tabla 2.1. Características generales de algunos polímeros

Polímero	Presencia	Función Fisiológica
Proteínas Seda Queratina Colágeno Gelatina Fibrinógeno Elastina Actina Miosina	Síntesis por artrópodos Cabello Tejidos conectivos Colágeno parcialmente amorfo Sangre Ligamentos del cuello Músculo Músculo	Protección Aislamiento térmico Soporte mecánico Producto industrial Coagulación sanguínea Soporte mecánico Contracción, movilidad Contracción, movilidad
Polisacáridos Celulosa Amilasa Quitina, Quitosano Glicosaminoglicanos	Plantas Plantas Insectos y crustáceos Tejidos conectivos	Soporte mecánico Reservorio de energía Proporciona forma Contribuye al soporte mecánico
Polinucleótidos DNA RNA	Núcleos celulares Núcleos celulares	Dirige biosíntesis de proteína Dirige biosíntesis de proteína

Fuente: J. San Román, S. de Aza, R. Sastre. (2004) Biomateriales. CYTED

2.2.2 Quitosano

El quitosano es el único polisacárido catiónico natural; ello le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones. En su estructura, el nitrógeno se encuentra como una amina alifática primaria y origina reacciones típicas de ese grupo funcional. (fig.2.1) Al igual que la quitina, el quitosano no se presenta como una molécula única; existe mucha variabilidad, no solamente en el tamaño de las cadenas sino también en el grado de deacetilación de las mismas. Esta variabilidad nos obliga a usar valores de peso molecular y grado de deacetilación promedios.

En el organismo humano, la N-acetil-D- glucosamina se encuentra unida con el ácido D-glucónico por enlaces alternativos β -1,4 y β -1-3. Estas uniones conforman la unidad repetitiva del ácido hialurónico, sustancia fundamental del tejido conjuntivo.³⁰

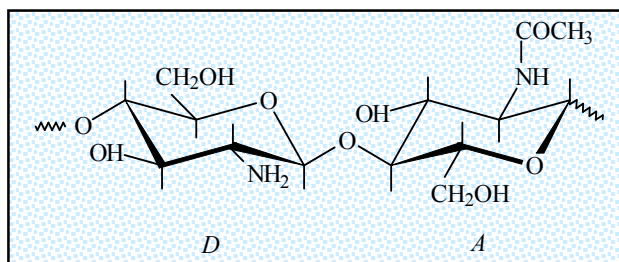


Figura 2.1. Unidades repetidas de quitosano:
D = D-glucosamina, A = N-acetil-D-glucosamina

El quitosano al ser una base, forma sales con ácidos y origina polielectrolitos cuyas solubilidades son función de la naturaleza del anión involucrado, del grado de deacetilación, del peso molecular del polímero y de la temperatura. El quitosano es soluble en diferentes medios, por ejemplo es soluble en ácidos inorgánicos como clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico y perclórico diluido.³¹

La quitina tiene una estructura cristalina altamente ordenada, como muestra los estudios de difracción de rayos X; se ha encontrado tres formas: α - β y γ - quitina. Estas formas difieren entre sí en la disposición de las cadenas dentro de las regiones cristalinas. En α - quitina las cadenas están dispuestas en forma

antiparalela; en β -quitina están en forma paralela y en γ -quitina dos cadenas están en una dirección y dos cadenas en otro. La forma mas abundante es la α -quitina, además esta forma parece ser la mas estable, ya que las otras dos formas son fácilmente convertidas a la forma α .

Como en el caso de la quitina, las moléculas de quitosano en estado sólido también están organizadas en regiones ordenadas y cristalinas. El grado de cristalinidad y la estructura molecular son los factores claves para explicar la solubilidad, la tensión mecánica y otras propiedades funcionales del quitosano.³²

2.2.3 Usos y Aplicaciones del Quitosano

a) Aplicaciones Biomédicas

Existen estudios que demuestran que el quitosano puede ser usado para inhibir fibroplasias y promover el crecimiento celular; por tal razón el quitosano es un polímero interesante para el área de desarrollo de biomateriales. Estas propiedades tienen especial relevancia (tabla 2.2), ya que provienen de un material natural, el hecho de ser un material biodegradable permitirá que los productos de la degradación como la glucosamida o la N- acetilglucosamida se dispersen en el organismo; el efecto regenerativo sobre el tejido conjuntivo y el hecho de acelerar la formación de osteoblastos.

Sandford y Steiner³³, reportan las siguientes propiedades biológicas para los quitosanos: hemostáticas, bacteriostáticas, fungistáticos, espermicidas, antitumoral, antiolesterolémica, inmunoadyuvante y sedante del sistema nervioso central.

Entre las aplicaciones biomédicas del quitosano (tabla 2.3) destaca su uso en los siguientes campos:

- Preparación de apósitos y vendajes para el tratamiento de heridas, dado su carácter hemostático y su efecto acelerador de la curación.
- Preparación de diferentes soportes, andamiajes cementos para la regeneración y reparación tisular.

Tabla 2.2. Roles biológicos del quitosano aplicados a tejidos humanos

Propiedades
<p>Ordenar al reconstrucción de tejidos :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Osteoinducción. ▪ Curación de lesiones en meniscos. ▪ Curación de úlceras y heridas. <p>Inmunoestimulación.</p> <p>Estimulación de la migración de estromas.</p> <p>Biodegradabilidad enzimática.</p> <p>Mucoadhesión.</p> <p>Actividad antimicrobiana :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Formación de complejos polielectrolitos. ▪ Quelación de metales de metaloenzimas. ▪ Inhibición de enzimas ligadas a quitina. ▪ Alteración de la adhesión bacteriana. <p>Importancia dietaria :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Actividad anticolesterolemica. ▪ Control de sobrepeso.

Fuente: A. Domard y col. p. 582.³⁰

Tabla 2.3: Formas físicas de derivados de quitina y sus aplicaciones biomédicas

Forma del material	
Soluciones	Agente bacteriostático. Agente hemostático. Cosmética.
Geles	Transporte de fármacos Espermicida.
Polvos	Talcos para guantes de cirugía. Inmovilización de enzimas.
Membranas/Películas	Membranas de diálisis. Lentes de contacto.
Parches	Agentes hemostáticos para mucosas. Vendas.
Diversas Formas Farmacéuticas	Materiales anticolesterolemicos. Agente antigastritis. Anticoagulantes.

Fuente: G. Skjak-Braek. col.³⁵

La quitina también se ha descrito como biocompatible, aunque su baja solubilidad es una limitación para su empleo.

b) Aplicaciones Farmacéuticas

En el campo farmacéutico a partir de la década de los 80 se empezó a estudiar el uso del quitosano como excipiente farmacéutico motivado por la similitud estructural y la reactividad química que presentaba con la celulosa.³⁶ Se ha descrito el uso de quitosano en importantes aplicaciones farmacéuticas tanto en formulaciones convencionales (p.e. matrices de liberación prolongada de drogas) como en aplicaciones más novedosas como terapia génica. Además se han descrito aplicaciones biomédicas como biomaterial bioadhesivo, fungistático, hemostático y para el tratamiento de heridas y quemaduras.³⁷

El quitosano no es tóxico, es fácilmente reabsorbible y buen formador de geles a bajo pH. Posee actividad antiácida y antiulcerante lo que evita o disminuye la irritación del fármaco en el estómago. Todo ello lo convierte en un candidato ideal para las formulaciones de liberación controlada.³⁸

La bioadhesividad del quitosano puede emplearse para incrementar el tiempo de residencia del fármaco en el tracto gastrointestinal y lograr una interacción más prolongada del mismo con el epitelio de las paredes del tracto digestivo. Las formulaciones bioadhesivas han sido utilizadas para la administración de fármacos al tracto gastrointestinal así como por vía, nasal, ocular y vaginal.³⁹

En los hidrogeles, la velocidad de liberación se ve afectada por la composición del polímero, densidad de entrecruzamiento, agente que se libera, polaridad, peso molecular, contenido de agua y la temperatura. Los hidrogeles poliméricos pueden ser preparados en diversas formas: películas, discos, cilindros o esferas, según los requerimientos de su uso final.

c) Aplicaciones en Alimentos

Se utiliza para recuperar materiales sólidos en residuos en industrias alimentarias; eliminar colorantes, sólidos, sustancias ácidas de jugos de frutas; y también para recuperación de proteínas y grasa del suero de quesos.

Entre otros usos, se pueden mencionar la purificación de agua de consumo, la inmovilización de enzimas, el encapsulamiento de nutraceuticos, las películas biodisponibles, los envases activos, los aditivos en alimentos para ganado y peces.³⁰

d) Aplicaciones en Agricultura

El uso de quitina y quitosanos en la agricultura se centra en mejorar los rendimientos agronómicos por medio de varios mecanismos. Las semillas recubiertas con soluciones de quitosano mejoran su germinación y producen altos rendimientos en la cosecha.⁴⁰

Los quitosanos interfieren en la generación de lesiones inducidas por infecciones virales en plantas.^{42, 43}

e) Aplicaciones en Tratamiento de Agua

Se proponen mecanismos de coagulación y floculación para aguas contaminadas con residuos orgánicos. Este polímero cargado positivamente tiene la habilidad de combinarse con moléculas con cargas negativas. La eficiencia de este proceso depende básicamente del pH. Bough demostró que es posible remover sólidos suspendidos de aguas residuales que provienen del procesamiento de vegetales.^{44, 45} La quitina y los quitosanos pueden usarse para remover metales, la eficiencia de este proceso dependerá de condiciones como la concentración, temperatura, tamaño de partícula de la muestra y, calidad y cantidad del biopolímero usado.⁴⁶

f) Aplicaciones Cosméticas

La actividad fungicida del quitosano y la capacidad para disolverse en ácidos orgánicos lo hacen compatibles con formulaciones de cremas, lociones y acondicionadores para el cabello. Entre los efectos positivos de los quitosanos en formulaciones cosméticas tenemos su compatibilidad con la piel, a la que protege actuando como una barrera física contra la radiación ultravioleta y la deshidratación. Su formulación en cremas aprovecha su carácter filmogénico, que permite una rápida disminución de las líneas de expresión.⁴⁷

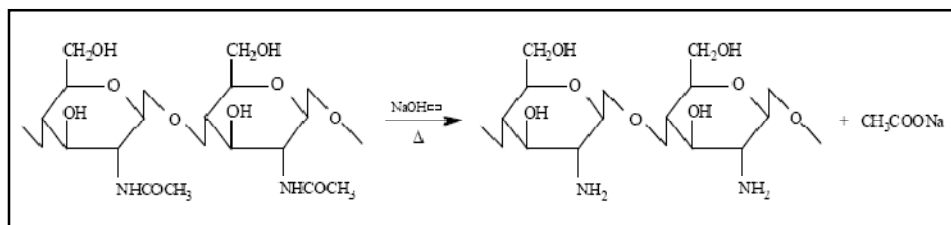
2.2.4 Caracterización del Quitosano

a) Determinación del grado de deacetilación

El quitosano, *poli* [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D- glucopiranososa] (Fig. 2.2), existe en baja concentración en la quitina nativa. También esta presente en algunos hongos, pero siempre en menor proporción que la quitina.⁴⁸ La quitina a lo largo de su cadena posee grupos N-acilos, y cuando se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas superiores a 60° C, se produce la reacción de deacetilación. Esta reacción consiste en la pérdida del resto acetilo de grupo amino del carbono 2, mientras queda un grupo amino en esa posición. El resultado es el quitosano, que presenta propiedades significativamente diferentes a la quitina.

Las condiciones a las que se llevan a cabo van a determinar el grado de deacetilación, pero también pueden reducir la longitud de las cadenas.^{49, 50} Condiciones suaves de reacción como someter la quitina a soluciones de 20% o 30% de NaOH y a menores temperaturas, van a limitar el grado de deacetilación que se pueda alcanzar; esto se debe a que las reacciones se dan en las regiones amorfas del polímero las que son mas accesibles para los reactivos. Por ejemplo en el caso de la β -quitina, su deacetilación es mas rápida que de la α -quitina. Este fenómeno se explica por la menor cristalinidad de la β -quitina, debido a la debilidad en sus fuerzas intermoleculares respecto a la α -quitina.

El quitosano es caracterizado por el grado de deacetilación y este es el porcentaje de grupos amino libres que posee la cadena principal. Actualmente se han desarrollado diversos métodos para la determinar el grado de N-acetilación del quitosano basados en diversas técnicas. Entre estas técnicas podemos destacar la espectroscopia infrarroja,^{51, 52,53} la espectroscopía UV⁵⁴, la espectroscopía de RMN⁵⁵, la potenciometría⁵⁶, y la conductometría.⁵⁷



Espectrosocopia ultravioleta (UV)

Fue desarrollado por Muzarelli y Roccheti⁵⁴ y se hace uso de la primera derivada del espectro UV de la N-acetilglucosamina y el quitosano.

Obteniéndose la concentración de quitosano por interpolación en la curva de calibración de la primera derivada de diferentes concentraciones de N-acetilglucosamina.

Valoración potenciométrica

La determinación potenciométrica del grado de N-acetilación del quitosano se realiza por el método descrito por Brousignac;⁵⁸ disolviendo quitosano en HCl y luego valorándolo con NaOH. Se obtiene así una curva de pH con dos puntos de inflexión que corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos amino; determinando el grado de acetilación del quitosano.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN de alta resolución es un método no invasivo muy útil para el estudio de estructuras químicas, además de ser el método mas preciso, ofrece la ventaja adicional de brindar información valiosa acerca de la secuencia de ambos residuos glucopiranosícos a los largo de la cadena polimérica.⁵⁹

b) Determinación del peso molecular

Los métodos utilizados para determinar el peso molecular de la quitina y quitosano son la viscosimetría, la dispersión de la luz, y la cromatografía de permeación de gel.

Viscosimetría

La viscosimetría es el método mas utilizado para obtener el peso molecular del quitosano. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que esta relacionada con el peso molecular de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.⁶⁰ Para la medida de la viscosidad de un polímero en solución se emplean viscosímetros de tipo capilar. En estos viscosímetros, se mide el tiempo que tarda el nivel del disolvente o la disolución en pasar entre dos marcas fijadas y se relaciona con la viscosidad mediante la ecuación de Poiseuille.^{61, 62}

c) Determinación del porcentaje de humedad

Tanto las muestras comerciales de quitosano como las que se obtienen en el laboratorio suelen tener diferentes contenidos de agua, por este motivo el porcentaje de humedad es un parámetro que debe considerarse al momento de trabajar con dichas muestras. El porcentaje de humedad se determina por gravimetría para ello se lleva a peso constante una muestra calentada en un horno a 105° C.

d) Determinación del contenido de cenizas

El contenido de cenizas es indicativo del contenido de materiales inorgánicos presentes en la muestra. Es un parámetro muy importante al momento de evaluar las aplicaciones de un determinado quitosano. Por ejemplo, en las aplicaciones biomédicas se requiere un valor muy bajo de este parámetro. En el caso del quitosano, el contenido de cenizas se determina gravimétricamente a partir del residuo obtenido tras la combustión de la muestra durante al menos 6 horas a 800° C.³⁰

e) Determinación del contenido de proteínas totales

La concentración de nitrógeno total se puede determinar por medio del análisis de aminoácidos en HPLC tras la hidrólisis con HCl₆N en presencia de fenol y en vacío a 105° C durante 18 horas o bien tras 2 horas de extracción de una cantidad conocida de muestra con un 2% (w/v) de solución KOH en proporción sólido/KOH 1:20 (w/v) a 90° C. El extracto de proteína obtenido se separa del material insoluble de la KOH mediante la filtración por medio de un embudo de vidrio. El contenido de proteína de la solución se determina por el método Kjeldahl.

2.2.5 Soluciones de Quitosano

La quitina se ha considerado como un polímero intratable y los estudios de las propiedades de sus soluciones han sido muy limitados, esto es debido a la escasa solubilidad de la quitina en la mayoría de los solventes conocidos sin que se produzca una degradación apreciable. En contraste, el quitosano al

poseer grupos aminos a largo de su cadena, permite la disolución de esta macromolécula en soluciones de ácidos diluidos por medio de la protonación de esos grupos originando una sal de quitosano.

En consecuencia la aparición de cargas positivas en la cadena domina en gran medida el comportamiento de las soluciones de quitosano. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que el carácter polielectrolito del quitosano influye en sus propiedades hidrodinámicas, ácido–base, conductimétricas y reológicas.

2.2.6 Propiedades del Quitosano

a. Propiedades fisicoquímicas

Las dos propiedades físico-químicas más importantes del quitosano, son el grado de deacetilación y el peso molecular.

El grado de deacetilación es un parámetro muy importante al momento de caracterizar estos biopolímeros. Este grado influye no solo en el resto de sus propiedades físico-químicas, sino también en su biodegradabilidad, solubilidad en soluciones ácidas, hinchamiento en agua, actividad inmunológica, bioactividad y biocompatibilidad. Este hecho es importante al momento de seleccionar un quitosano adecuado para cada aplicación. Por ejemplo cuando lo utilizamos para inmovilización de células, un mayor grado de deacetilación nos proporciona una mayor adhesión celular a las películas del quitosano.¹⁰

El quitosano es insoluble a pH neutro y alcalino, pero son solubles con ácidos orgánicos e inorgánicos incluyendo ácido glutámico, hidroclorehídrico, láctico y acético. En medios ácidos, el grupo amino del polímero se protona y la molécula se carga positivamente.⁶³

Las propiedades del quitosano pueden ser modificadas cambiando el grado de deacetilación como el pH y la fuerza iónica. Con un pH neutro la mayoría de las moléculas de quitosano pierden su carga y precipitan en la solución. La derivatización química del quitosano proporciona un poderoso medio para promover nuevas actividades biológicas y modificar las propiedades mecánicas. Los principales grupos aminos en la molécula son reactivos y proporcionan un mecanismo para unir ese lado usando una variedad de condiciones suaves de reacción. El efecto general de la adición es alterar la

estructura cristalina del material por lo tanto incrementar la fracción amorfa. Esta modificación genera un material con baja rigidez y a menudo alterando la solubilidad pero la naturaleza de los cambios en las propiedades químicas y biológicas depende de la naturaleza del grupo que se une.⁶⁴

La variedad de grupos que pueden ser unidos al quitosano es casi ilimitada, y el grupo puede ser elegido para funciones específicas, alterar propiedades biológicas o modificar propiedades físicas. Debido a su alto peso molecular y su estructura lineal no ramificada, el quitosano es un excelente agente que realza su viscosidad en medios ácidos. La viscosidad de la solución de quitosano se incrementa con el aumento de la concentración de quitosano, decrece con el aumento de la temperatura y el grado de deacetilación, que es un parámetro estructural también influenciado por propiedades fisicoquímicas como el peso molecular.⁶⁵

La viscosidad también influye en las propiedades biológicas como propiedades de curación de herida y osteogénesis, además de la degradación por lisozimas.⁶⁶

La solubilidad del quitosano puede ser reducida bruscamente por entrecruzamiento de las moléculas con uniones covalentes usando por ejemplo glutaraldehído.⁶⁷

Cuanto mayor es el peso molecular del quitosano, existe mayor número de grupos amino protonados en una solución ácida de quitosano. De este modo hay un mayor número de cargas positivas que pueden interaccionar con las cargas negativas del tripolifosfato, que es un polianión. Sin embargo no es conveniente poner mucha cantidad de principio activo, ya que existe una gran pérdida del mismo durante el proceso de gelificación.⁶⁸

Cuanto mayor es el grado de deacetilación, menor es la adhesión de determinadas células, como fibroblastos. La adhesión también depende mucho del tipo de célula de que se trate; los queratinocitos se adhieren hasta dos veces mejor que los fibroblastos.

El quitosano se puede utilizar en diferentes aplicaciones en función del peso molecular, como regulador de la viscosidad, estabilizador, agente bioactivo con hongos, vehículo de liberación controlada.³⁰

b. Propiedades biológicas

El quitosano ha sido usado como un excipiente seguro en formulaciones de drogas en los últimas dos décadas. El quitosano en el estado hinchado ha sido presentado para ser un excelente mucoadhesivo y como un polímero natural bioadhesivo que puede adherirse en tejidos duros y blandos, es también usado en odontología, ortopedia, oftalmología y en procedimientos quirúrgicos.

El quitosano es fácilmente hidrolizado por varias quitozanasas, completamente ausentes en mamíferos; y dependiendo del grado de deacetilación por lisozimas. Esta biodegradación conduce a liberar aminoazúcares que pueden ser incorporados dentro de la ruta metabólica de glucosaminoglicanos y glicoproteínas, o excretado.^{69,70}

Biodegradación

La quitina y el quitosano son moléculas totalmente ausentes en mamíferos, se degradan y reabsorben “*in vivo*”. Esta característica y otras, como su biocompatibilidad y versatilidad, los hacen polímeros muy atractivos para aplicaciones biomédicas. Esta degradación se debe principalmente a la susceptibilidad de ser hidrolizado enzimáticamente por la lisozima, una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano, aunque también parece haber evidencias de la actividad hidrolítica de otras enzimas proteolíticas como pepsina, papaína o pancreatina. La degradación de estos polímeros vía lisozima depende del grado de deacetilación. El quitosano totalmente deacetilado no es sensible a la acción de esta enzima, mientras que la quitina o quitosanos parcialmente deacetilado si lo son.

De hecho, parece que son necesarias tres unidades consecutivas acetiladas para que el sustrato sea reconocido por la lisozima, aunque el mecanismo de degradación no esta completamente elucidado; el empaquetamiento cristalino y su influencia en la accesibilidad de la enzima también parecen ser importantes. En cualquier caso, polímeros altamente deacetilados se degradan vía lisozima más lentamente que aquellos con bajos grados de deacetilación. Además del grado de deacetilación, otros parámetros como el peso molecular, el pH o, incluso, el método de obtención influyen en la biodegradación.

La biodegradación mediante la acción de la lisozima produce oligosacáridos no tóxicos que pueden ser posteriormente degradados por otras enzimas. El estudio y análisis de los diferentes factores que afectan a la biodegradación es importante, no solamente a la hora de elucidar si esta tiene o no lugar sino porque la velocidad de biodegradación definirá su funcionalidad en una aplicación concreta. Además esta velocidad de biodegradación también influirá en la biocompatibilidad ya que una degradación demasiado rápida puede originar una reacción inflamatoria aguda asociada a la acumulación de productos de degradación.

Biocompatibilidad

La respuesta biológica de estos compuestos, así como cualquiera de sus propiedades, dependerá de sus características particulares, es decir, de su fuente y método de obtención, del peso molecular, del grado de deacetilación, etc. La mayoría de los estudios biológicos han sido llevados a cabo con quitosano antes que con quitina, debido a su mayor interés y versatilidad.^{25, 70}

La quitina y especialmente el quitosano activan los sistemas de coagulación, debido a la masiva adsorción de proteínas sobre su superficie. Esta adsorción desencadena una respuesta trombogénica presentan por lo tanto muy buenas propiedades hemostáticas; en el caso del quitosano incluso en condiciones anticoagulantes. Aunque la quitina es un inductor de la agregación plaquetaria mas potente que el quitosano, por que provoca agregación de eritrocitos.

Como otros polímeros, el quitosano se une fuertemente a los glóbulos rojos y se comporta como un potente aglutinante celular, incluso a bajas concentraciones y bajo tratamiento con heparina. En este sentido, se han realizado numerosos esfuerzos con el fin de conseguir un material hemocompatible que conserve las buenas propiedades del polisacárido, biodegradabilidad y capacidad de formar películas.⁷⁰

c. Osteoinducción

El quitosano ha sido descrito como promotor de la formación de hueso. Las células madres mesenquimales cultivadas en presencia de quitosano han

demostrado un aumento en la diferenciación a osteoblastos comparado con los cultivos en ausencia del mismo.

Los cementos óseos hechos sobre la base de fosfatos cálcicos son materiales ortopédicos utilizados para relleno de cavidades óseas. La matriz polimérica biodegradable tiene la principal misión de evitar la migración de las cargas inorgánicas y facilitar la sustitución de la misma por hueso neo formado de acuerdo con su velocidad de biodegradación. Este carácter biodegradable, aunque permite la regeneración total del tejido óseo, presenta el inconveniente de que las propiedades mecánicas durante los primeros estadios de la regeneración son muy pobres y pueden no ser apropiadas para el tratamiento de defectos que deban de soportar altas cargas.^{29, 30}

d. Liberación de fármacos

La vía de administración oral es la mas antigua y quizás la ruta de liberación de fármacos mejor aceptada. El sistema de diseño de este modo de administración ha sufrido una gran metamorfosis desde los comprimidos de recubrimiento entérico hasta los sofisticados sistemas de liberación de orden cero.

Para las aplicaciones orales, el quitosano se ha utilizado como diluyente en tabletas de compresión directa, en las que actúa como desintegrante^{70, 71} y su actividad antiácida y antiulcerosa previene o debilita la irritación del fármaco en el estómago.⁷²

Las tabletas del complejo quitosano/alginato redujeron el hinchamiento y la erosión, y permitieron controlar la liberación de teofilina. Las tabletas de quitosano/alginato también resultaron superiores como sistema de liberación controlada de indometacina que las de quitosano solo.⁷³

d. Curación de herida

La estructura química del quitosano que es similar al de ácido del hialurónico, sugirió que habría de actuar como un agente en curación de herida.⁷⁴ Los mecanismos de la aceleración de curación de herida han sido investigado *in vitro* e *in vivo* por varios investigadores.^{75,76,77} Se han estado desarrollando quitina y quitosano, para su uso en veterinaria y ellos han informado sus

efectos clínicos en la curación herida y sus actividades biológicas.^{18,78} Encontraron que estos polímeros y sus productos aceleran la curación de herida, la frecuencia de tratamiento decrece, y da protección a la superficie de la herida sin dolor. En resumen acelera la curación de la herida, el quitosano es también capaz de activar a las defensas del organismo para prevenir la infección ofreciendo una alternativa al uso de los antibióticos.

La facilidad de adhesión del quitosano, así como su carácter antifúngico, bacteriostático y su permeabilidad al oxígeno son propiedades muy atractivas para su uso tópico o externo en la preparación de este tipo de dispositivos para el tratamiento de heridas y quemaduras.

A principios de la segunda mitad del siglo XX, se describió la capacidad del cartílago de tiburón como acelerador en la curación y cicatrización de heridas; esta capacidad se asoció a la glucosamina y a la N-acetilglucosamina, dos componentes de la quitina y el quitosano que también presentan propiedades aceleradoras en la curación de heridas y son usados actualmente en veterinaria. Existen numerosos estudios que describen este efecto.⁹

e. Actividad antimicrobiana

Además de los requisitos para la curación de la herida es importante controlar cualquier infección con el apósito debajo de la herida. El quitosano se ha mostrado como inhibidor de la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas.^{5, 79}

La actividad antimicrobiana del quitosano se ha reconocido contra varias bacterias y hongos, y es influenciada por varios de factores en el que se incluyen el tipo de quitosano, el grado de polimerización y algunas de sus propiedades físicas y químico.^{70, 80, 81}

El quitosano inhibe crecimiento de bacterias eficazmente, pero los efectos inhibitorios difieren con respecto al peso molecular de quitosano y el tipo de bacteria. El quitosano generalmente ejerce los efectos bactericidas más fuertes contra gram-positivo que las bacterias gram-negativas. La actividad antibacteriana de quitosano es afectado por el pH y su mayor actividad se encuentra con bajos valores de pH (el pH 4.5–5.9 rango probado).⁸²

f. Terapia de regeneración tisular

El quitosano es un excelente candidato para este fin. La quitina presenta buenas propiedades mecánicas, es biodegradable y biocompatible y por ello se ha propuesto en alguna aplicación en este campo pero no posee la cationicidad del quitosano que esta asociada a algunos de los comportamientos o respuestas biológicas, ni su facilidad de manipulación, por lo que el interés que ha despertado en este campo es escaso.⁷⁰

Un buen material soporte de los andamiajes en los que van a crecer las células debe interaccionar favorablemente con las mismas y con el medio, además debe ser preferentemente biodegradable. El objetivo último es la completa regeneración del tejido y debe permitir la fácil preparación de soportes adecuados como los sistemas tridimensionales porosos, con poros interconectados. Estas propiedades pueden ser complementadas con una estimulación activa del proceso regenerativo mediante la dosificación controlada de ciertos factores de crecimiento. Las unidades estructurales sacarídicas del quitosano, la GlcN y la GlcNAc, están presentes en diferentes GAG. Estos compuestos son heteropolisacaridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos. En su estado natural, varios GAG se encuentran unidos covalentemente a proteínas centrales y forman los proteoglicanos, que juegan un papel muy importante en la organización y funcionamiento de la matriz extracelular. El quitosano, por lo tanto es un compuesto análogo a los GAG, y eso le confiere alguna de sus actividades biológicas.

2.2.7 Hidrogeles de Quitosano

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas que se hinchan en agua o fluidos biológicos. Estos hidrogeles pueden absorber hasta mil veces su peso seco en agua. Esta propiedad de absorber agua los convierte en materiales de enorme interés, sobre todo en medicina como sistemas de liberación controlada de principios activos, dispositivos para diagnóstico, sustrato para el cultivo de células, geles para electroforesis, desintoxicantes sanguíneos, membranas para

hemodiálisis, sistemas terapéuticos biodegradables, lentes de contactos e implantes.

Los hidrogeles se clasifican en químicos y físicos. Dentro de la primeras tres tipos: *i)* hidrogeles formados solamente por el polímero y un agente entrecruzante, *ii)* los denominados hidrogeles híbridos, en los que el agente entrecruzante enlaza cadenas de polímero diferentes; *iii)* y los retículos semi-o completamente interpenetrados.³⁰

Es importante ajustar las reacciones de reacción de entrecruzamiento, por que estas determinaran el modelo a seguir y el grado de entrecruzamiento a obtener. Este último es un parámetro importante que influye en propiedades interesantes de los hidrogeles, como son la liberación de fármacos y la fortaleza mecánica.^{83, 84}

2.2.8 Evaluación de las propiedades físicas y biológicas de las esponjas de quitosano

a. Propiedades de hinchamiento

Durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la red asumen una configuración elongada y esta dilatación va acompañada de la aparición de una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, que actúa como una presión que las cadenas de la malla ejercen sobre el disolvente contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el disolvente aumenta dicha presión elástica y el hinchamiento alcanza su valor máximo o de equilibrio cuando se obtiene un balance entre ambas fuerzas. La reacción elástica de la red puede ser interpretada como una presión actuando en la disolución o el gel hinchado. En el estado de equilibrio esta presión es suficiente para incrementar el potencial químico del disolvente en la disolución de forma tal que compense el valor debido al exceso de disolvente alrededor del gel hinchado.^{11, 83,84}

Los hidrogeles de quitosano contienen mucha agua, parte de esta agua esta bien enlazada presente como agua ligada al polímero y el resto esta presente como agua libre. La habilidad de estos hidrogeles para hincharse y deshidratarse depende de la composición y el ambiente en el cual ha sido explotado para facilitar un rango de aplicaciones como liberación de droga.

Otro aspecto significativo es la influencia del porcentaje del agente entrecruzante sobre el grado de hinchamiento en los hidrogeles sintetizados, así pues, el grado de hinchamiento máximo disminuye a medida que aumenta el porcentaje de agente entrecruzante, debido a que aumenta la densidad de reticulación en el hidrogel.

b. Propiedades Superficiales

Casi todas las muestras sólidas tienen porosidad de algún tipo. La importancia de la medida de la porosidad dependerá del uso que se dé al material.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Un punto a tener en cuenta a la hora de preparar la muestra es que la técnica a emplear no debe de afectar a lo que se quiere observar o medir, y de hacerlo ha de conocerse de antemano el efecto que tendrá.

Si se trata de un material aislante, hay que proceder a recubrirlo con un agente conductor. Si se van a llevar a cabo observaciones a muy bajo voltaje. Se pueden recubrir con carbón o con metales, dentro de ellos el mas empleado es el oro; el metal da un mejor y uniforme recubrimiento y evita que se cargue la muestra de forma más efectiva que lo hace el carbón.

Dentro de los fenómenos que tiene lugar en la muestra bajo el impacto de los electrones, el más importante en SEM es la emisión de electrones secundarios con energías de una cuantas decenas de eV, seguido de la emisión de electrones retrodispersados con mayores energías. Los electrones secundarios son emitidos por la muestra en procesos inelástico de ionización debido a la colisión con el haz incidente, altamente energético.⁸⁵

Porosidad

La necesidad de la porosidad en la regeneración del hueso lo demostró Kuboki y col. usando en una rata, partículas sólidas y porosas de hidroxiapatita. No se formó nuevo hueso sobre las partículas sólidas, mientras en los andamios porosos ocurrió osteogénesis directa.⁸⁶

Además se apoya en los estudios en ovejas con implantes metálicos cubierto de poros, comparados con los materiales no cubiertos. El tratamiento de la superficie de la aleación de titanio implantado con las del titanio sinterizado

crearon una capa porosa que mejoró la fuerza cortical de los implantes recuperados de la tibia de la oveja.⁹⁰

Tamaño de poro

Existen diversos métodos para la medición del tamaño de poro y porosidad, ya sea por intrusión de mercurio, y SEM.⁸⁵

En la microscopía electrónica (SEM), las imágenes son analizadas con varios software de computadora para medir la porosidad y, particularmente, tamaños los poros.^{87, 88,89} Para el análisis estadístico, se usan diferentes tamaños de muestras, por ejemplo, de un rango medidas desde 10 a 40 poros hasta un mínimo de 100.^{87, 88,90}

La osteogénesis in vitro no es afectada por el tamaño de poro, sin embargo las dimensiones de los poros estudiados son una magnitud menor que el mínimo requerido para la osteogénesis in vivo y que en un medio donde la osteogénesis depende de otros procesos como la vascularización, el efecto de la porosidad pudiera ser opuesto.

La ausencia de reportes con efectos beneficiosos de andamiajes de baja porosidad in vivo, fortifica el requisito de injertos muy porosos para la regeneración ósea.

c. Propiedades mecánicas

El empleo de un determinado biomaterial en el diseño de un dispositivo biomédico obliga a evaluar su capacidad de soportar las cargas mecánicas a las que va a estar sometido durante el cumplimiento de su función específica. Cualquier estado de carga complejo puede expresarse en función de los siguientes modos de sollicitación básicos: fuerzas axiales (tracción y compresión), fuerza de corte, momento de flexión, momento de torsión.

La ciencia de materiales abarca el estudio de los componentes y procesos de fabricación que permiten obtener biomateriales con la estructura y propiedades específicas deseadas. Los polímeros están formados por largas cadenas de moléculas orgánicas que pueden estar libres o unidas entre sí a través de algunos enlaces covalentes o fuerzas secundarias.²⁹

El estudio del comportamiento de los materiales ante la acción de fuerzas externas es lo que se denomina: propiedades mecánicas; este estudio analiza el comportamiento de la estructura interna de la materia ante la acción de fuerzas externas, que se denominan cargas.

Tipos de ensayo

Dependiendo de las condiciones de ensayo, geometría de probeta, se distinguen dos grandes tipos de ensayos: *estáticos* y *dinámicos*. Los primeros incluyen: tracción, compresión, flexión en tres (o cuatro) puntos y fractura, mientras que entre los segundos se encuentran: fatiga, impacto, fluencia (*creep*)

Tracción (tensile test)

La máquina para realizar los ensayos de tracción consta de un brazo fijo y uno móvil, ambos dotados con unas mordazas donde se sujetan firmemente y en forma vertical las probetas. Las probetas que se emplean se preparan normalmente mediante moldeo, o corte a partir de zonas planas de las piezas ya transformadas.

La geometría de las probetas y sus dimensiones son normalizadas a los efectos de asegurar el campo de tensión en la zona de medida de acuerdo al modo de sollicitación evaluado. Puesto que las propiedades mecánicas de muchos materiales son sensibles a cambios en temperatura y humedad se deben protocolizar los procesos previos de condicionamiento de probetas y realizar los ensayos según la norma correspondiente.

La deformación observada cuando se aplica una carga dada, depende del material, la geometría de la probeta y la temperatura a la que se efectúa el ensayo. Por lo tanto en el caso de estructuras con formas complejas, resulta difícil comparar la rigidez de materiales diferentes o predecir la capacidad para soportar carga.

El esfuerzo normalmente se expresa en MPa ($1 \text{ MPa} = 1 \text{ N/mm}^2$), mientras que la deformación se expresa normalmente como porcentaje (%).

d. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se puede definir como la aceptabilidad biológica y es estudio de la interacción de los biomateriales con los tejidos del organismo.

Esta aceptabilidad biológica se puede examinar desde varios niveles, como son las interacciones entre el material y los tejidos; la reacción resultante de la degradación y los factores mecánicos.

Todo proceso de implante puede considerarse un foco de irritación o un estímulo hacia el tejido. La primera reacción será la inflamación, le sigue un proceso reparador, y finalmente una cicatrización de la incisión. El tiempo de transición entre la inflamación y la reparación, depende de la severidad de la lesión o injuria.²⁹

En la respuesta del organismo a los implantes de biomateriales la quimiotaxis, es potencialmente una de las mas importantes actividades biológicas. Esta particular función ocurre con los macrófagos y otros fagocitos, y puede alterarse cuando se produce una implantación, en el cuerpo humano, pudiendo afectar por si mismo al funcionamiento del biomaterial. Estímulos quimiotácticos producirán que estas células se desplacen hacia el origen del estímulo. Todo implante será un material extraño para el cuerpo, pudiendo ser considerado como un "estímulo".

Existe una gran multitud de test que podemos utilizar en el estudio de la biocompatibilidad de los biomateriales. (Tabla 2.4)

Tabla 2.4: Tipos de test biológicos utilizados en los estudios de biocompatibilidad de los materiales ²⁹

1. METODOLOGIAS " <i>in vitro</i> ":
1.1. Estudios de citotoxicidad.
1.1.1. Contacto directo con el cultivo celular. 1.1.2. Contacto indirecto del extracto del material con el cultivo celular. 1.1.3. Contacto indirecto por difusión en agar en cultivo celular.
1.2. Estudios de proliferación y adherencia celular.
1.3. Estudios de biodegradación.
1.3.1. Test de biodegradabilidad. 1.3.2. Ensayo de biodegradación mediante hidrólisis en soluciones salinas y enzimáticas. 1.3.3. Ensayo de biodegradabilidad en cultivo de macrófagos.
1.4. Estudios de mutagénesis.
1.4.1. Test de Ames. 1.4.2. Contacto del material con células linfoides.
2. METODOLOGIAS " <i>in vivo</i> "
2.1. Estudios de implantación.
2.1.1. Evaluación de materiales implantados en el músculo durante 7 días en rata o conejo. 2.1.2. Evaluación de la compatibilidad de biomateriales no porosos para implantes quirúrgicos en músculo durante periodos largos de tiempo en ratón, conejo o perro. 2.1.3. Ensayo de implantación intraósea en ratón, conejo o perro. 2.1.4. Ensayo de evaluación de biocompatibilidad mediante la implantación subcutánea de "cages" de acero inoxidable.
2.2. Estudios de irritación y sensibilización.
2.2.1. Ensayo de biomateriales en conejo para evaluar la irritación dérmica primaria. 2.2.2. Ensayo de irritación ocular. 2.2.3. Ensayo de sensibilización de cobayos Albinos. 2.2.4. Evaluación de materiales por inyección intracutánea en conejo. 2.2.5. Evaluación de extractos de materiales por inyección sistémica en ratón.
2.3. Estudios de carcinogénesis y teratogénesis en rata.
2.4. Estudios de hemocompatibilidad.
2.4.1. Estudio de la capacidad trombogénica del biomaterial en la carótida de conejo.

2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las propiedades físicas y biológicas de las esponjas de quitosano/TCP y esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas con tripolifosfato de calcio para su aplicación como biomaterial?

2.4 JUSTIFICACION

Este estudio se ha propuesto analizar las propiedades de esponjas de quitosano creadas, y si estas permitirían que tengan utilidad en el cultivo celular y los procesos de regeneración de tejidos, como por ejemplo como sistema de andamiaje en regeneración ósea o como matrices para cultivo celular.

Si además se incorpora fármacos dentro de estos materiales, se puede lograr sistemas de liberación controlada de fármacos. Este hecho es útil por que se puede evitar efectos secundarios, además se asegura que el fármaco es liberado en el lugar indicado.

2.5 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Caracterizar las propiedades físicas y biológicas de las esponja de quitosano/TCP y esponja de quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato para su aplicación como biomaterial.

Objetivos Específicos

- Diseñar el procedimiento para la obtención de esponjas de quitosano/TCP.
- Determinar y comparar la resistencia de las esponjas de quitosano/TCP y quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio.
- Determinar y comparar el grado hinchamiento de la esponjas de quitosano/TCP y quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio mediante el método gravimétrico a los 10', 20', 30', 1h, 2h, 4h y 6h.

- Evaluar y comparar la porosidad y el tamaño de poro de las esponjas de quitosano/TCP y quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Evaluar y comparar la biocompatibilidad de las esponjas de quitosano/TCP y quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio implantándolo en el tejido celular subcutáneo de ratas Holtzmann.

2.6 HIPÓTESIS

Las propiedades físicas (mecánicas, hinchamiento, superficie) y biológicas (biocompatibilidad) de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio y de quitosano/TCP sin entrecruzar permiten que sean utilizadas como biomaterial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

- *Descriptivo*: por que el investigador registró los resultados que se realizaron en cada prueba.
- *Analítico*: Porque estudia la influencia del entrecruzamiento o no del polímero en las propiedades que posee.
- *Transversal*: por que se estudiaron las variables simultáneamente en un determinado tiempo.
- *Prospectivo*: los hechos se registraron conforme iban sucediendo.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

La población estuvo conformada por todas las esponjas preparadas en el Laboratorio de Química Analítica de la Sección Química de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la PUCP.

Muestra

Para las pruebas se utilizó las muestras que se detallan en la tabla 3.1.

Las pruebas físicas tienen un estándar para su evaluación ya establecido; para las pruebas mecánicas según la norma ASTM (American Society of Testing Materials), para la determinación del tamaño de poro usando un software de imágenes, para la determinación del grado de hinchamiento mediante el método gravimétrico y para la implantación en la prueba de biocompatibilidad se utilizó 22 ratas Holtzmann de 3 meses de edad, con un peso promedio de 250 a 300 gr. elegidas del bioterio experimental del Centro Nacional de Salud (CENASA), que fueron mantenidos en el bioterio del IESN.

3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Variables	Naturaleza	Dimensión	Conceptualización	Indicador	Escala	Valor
Independientes Tipo de esponja	Cualitativa	-----	Polímero natural de tipo polisacárido catiónico	Propiedades que indican si son entrecruzadas o no	Nominal Dicotomías	Esponjas de Quitosano/TCP entrecruzadas Esponjas de Quitosano/TCP no entrecruzadas
Dependientes Propiedades físicas y biológicas de las esponjas	Cuantitativa	Hinchamiento	Capacidad de retener agua	Variación de peso	Proporción	mg
	Cuantitativa	Tamaño de poro	Longitud del espacio vacío entre las cadenas del polímero	Diámetro de Poro	Proporción	μ
	Cuantitativa	Porosidad	Porcentaje de espacios vacíos en la esponja	Número de Poros	Proporción	porcentaje
	Cualitativa	Resistencia	Esfuerzo a la tracción en el corte	Ruptura a la tracción	Ordinal	Rígido: > a 700 Mpa. Semirígido: 70 a 700 Mpa. Blando: < 70 Mpa.
	Cualitativa	Biocompatibilidad	Reacción Inflamatoria Aguda	Edema Vasoconstricción Polimorfo nucleares	Ordinal	0: Ausencia de Inflamación 1: Inflamación Leve 2: Inflamación Moderada 3: Inflamación Severa
			Reacción Inflamatoria Crónica	Fibrosis Linfocitos Monocitos Células plasmáticas	Ordinal	0: Ausencia de Inflamación 1: Inflamación Leve 2: Inflamación Moderada 3: Inflamación Severa

3.4 MATERIALES

3.4.1 Quitosano

Obtenido en la planta piloto PUCP de obtención de quitosano, a partir de caparazones de “*Litopenaeus Vannamei*” (langostas), se aisló quitina la cual se deacetiló para obtener quitosano.

3.4.2 Tripolifosfato de calcio

El tripolifosfato de calcio de Sigma-Aldrich Inc. (0.5 gr. En solución al 5%)

3.4.3 Otros

- Fosfato tricalcico (TCP)
- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Etanol grado p.a.
- NaOH p.a. en lentejas

3.5 PREPARACIÓN DE LAS ESPONJAS DE QUITOSANO

3.5.1. Preparación de las soluciones de quitosano

El quitosano fue utilizado para la preparación de soluciones las cuales se hicieron al 5% p/v en ácido acético al 1% p/v, agitando durante 4 horas a temperatura ambiente; luego se adicionó 0.5gr de fosfato tricalcico y se continuo agitando hasta obtener una solución homogénea. Antes de ser utilizadas, las soluciones se dejaron en reposo a 4° C durante 24 horas.

3.5.2. Preparación de las esponjas

Se agregaron exactamente 10 mL de la solución de quitosano sobre los recipientes de 8 cm por 8 cm las cuales se dejaron en reposo toda la noche a 0°C, luego se llevó a liofilización hasta peso constante. Las esponjas de quitosano fueron cuidadosamente extraídas de los recipientes. El pH de las esponjas se determinó incubando una pequeña muestra en agua durante 24 horas a 40°C, utilizando para la medición un pHmetro.

3.6 NEUTRALIZACIÓN DE LAS ESPONJAS

Un grupo de las esponjas de quitosano fueron sumergidas en un recipiente durante 5 minutos en 100 mL de una solución de NaOH 0,1 M luego lavadas 3 veces durante 10 minutos cada vez con 100 mL de una solución de agua – etanol (20:80) para eliminar el exceso de álcali. Luego las esponjas fueron secadas a 40° C. El pH de las esponjas se determinó incubando una pequeña muestra en agua durante 24 horas a 40°C, utilizando para la medición un pHmetro.

3.7 PREPARACIÓN DE HIDROGELES

3.7.1. Preparación de la solución de tripolifosfato de calcio

Se prepararon soluciones de tripolifosfato de calcio al 5% p/v en agua destilada, disolviendo el polvo con agitación constante durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.7.2. Preparación de hidrogeles de quitosano

Para la preparación de los hidrogeles de quitosano se procedió a realizar el entrecruzamiento sumergiendo las esponjas de quitosano en la solución de tripolifosfato. La esponja humedecida se llevó a congelación toda la noche a 0° C, luego se llevó a liofilizar hasta peso constante, obteniéndose los hidrogeles de quitosano/TCP (esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas), que fueron cuidadosamente extraídas de los recipientes para la evaluación del pH.

3.8 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ENSAYO

Las esponjas fueron cortadas con un bisturí de acuerdo con las dimensiones necesarias para cada uno de los ensayos (tabla 3.1) cuidando que los bordes queden uniformes. Se midió el espesor con un micrómetro digital en distintos puntos de las películas, de acuerdo con las medidas de cada una, se calculó el espesor promedio.

Las esponjas ya cortadas se almacenaron en una sala de temperatura y ambiente controlado (21 ± 1 °C y $50 \pm 2\%$ HR) por una semana antes de ser utilizadas. Las muestras destinadas a la biocompatibilidad se esterilizaron con óxido de etileno.

Tabla 3.1. Descripción de las esponjas acondicionadas para los ensayos

ENSAYOS	FORMA DE LAS MUESTRAS	MEDIDAS DE LAS ESPONJAS (mm)	PUNTOS DE MEDICIÓN DEL ESPESOR	ESTERILIZACION
Mecánicos	Rectangular	10 x 50	3	No
Hinchamiento	Cuadrangular	10 x 10	3	No
Superficie	Cuadrangular	10 x 10	3	No
Biocompatibilidad	Cuadrangular	5 x 5	1	Si

3.9 EVALUACIÓN DE LAS ESPONJAS

3.9.1. Determinación de las propiedades mecánicas

Se realizó en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Se evaluó el Alargamiento Porcentual (A%) y el Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) en Nmm^{-2} , de acuerdo con la Norma Oficial Chilena Nch1151.Of.76⁹³, equivalente a la norma internacional ISO R1184-1970, con algunas modificaciones que se detallarán a continuación.

Se utilizaron 5 esponjas de cada tipo con dimensiones de 1 x 5cm. Las mediciones se realizaron en un analizador de textura equipado con una celda de carga de 5 kN. En el anexo 1y 2 se diagrama el equipo utilizado y los parámetros ingresados en el software de control del analizador de textura.

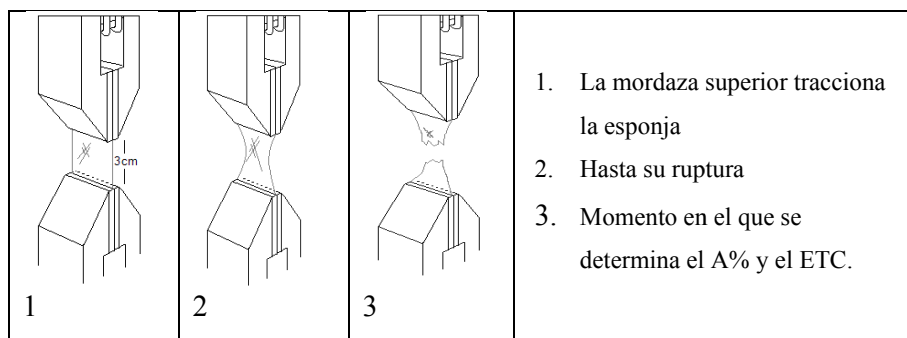


Figura 3.1. Diagrama de los ensayos mecánicos realizados a las esponjas.

Fuente: Laboratorio de Operaciones Unitarias. Universidad de Chile

Las esponjas fueron colocadas entre dos mordazas de aluminio, instaladas en el analizador de textura y separadas por una distancia de 3 cm. Se apretaron las mordazas firme y uniformemente para evitar que las esponjas se deslizaran durante los ensayos. Las esponjas fueron traccionadas por la mordaza a una velocidad de 20 mm/min. Se registró la curva carga vs. alargamiento hasta el punto de ruptura (figura 3.1).

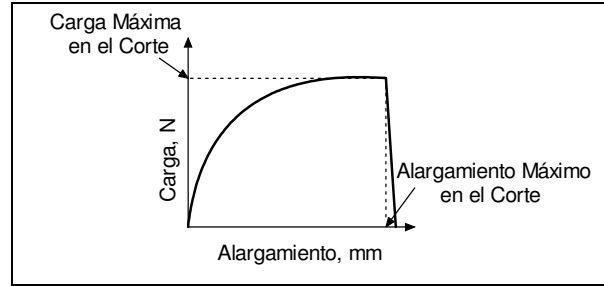


Figura 3.2. Diagrama del gráfico Carga vs. Extensión

En la figura 3.2 se diagraman aquellos puntos importantes en el cálculo de las propiedades mecánicas. El ETC se calcula dividiendo la fuerza máxima en el corte por el área de la sección transversal inicial de las películas (Ecuaciones 1 y 2). El A% se calcula dividiendo el alargamiento máximo en el corte por el largo inicial la esponja (Ecuación 3).

$$ETC = \frac{C_{\max}}{AR} \quad (1)$$

Donde:

ETC: Esfuerzo de tracción en el corte, en Nmm^{-2}

C_{\max} : Carga máxima de tracción en el corte de la esponja, en N

A_R : Área transversal inicial de la esponja, en mm^2

$$AR = \varepsilon x A \quad (2)$$

Donde:

ε : Espesor de la esponja, en mm

A: Ancho de la esponja, en mm

$$A\% = \frac{D_f - D_i}{D_i} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

A%: Alargamiento porcentual

D_f: Distancia de alargamiento hasta el corte, en mm

D_i: Distancia inicial de referencia, en mm

3.9.2. Determinación de la microestructura de las esponjas

Se realizó en el Laboratorio de Ciencia de los Materiales de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

La microestructura superficial y transversal de las esponjas fue caracterizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (anexo 3).

Las esponjas fueron cortadas en tres segmentos, y cada segmento estuvo recubierto con un agente conductor por un tiempo de tres minutos hasta obtener un espesor de 150 Å, que para este estudio fue un baño de oro. Las muestras fueron examinadas bajo un Microscopio Electrónico de Barrido a una aceleración de voltaje de 15 kV. El promedio del tamaño de poro de la muestra será analizado usando el software NIH Image. Cada segmento de la esponja será escaneada y se tomará la fotografía de la sección que represente una mejor distribución del tamaño de poro.

Para la determinación de la porosidad se utilizó la siguiente fórmula (4):

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{D \times A - (W_m / \rho_p)}{D \times A} \quad (4)$$

Donde:

D: espesor de la esponja

A: área de la esponja

ρ_p: densidad del quitosano

W_m: peso de la esponja

3.9.3. Determinación del grado de hinchamiento

Se realizó en el Laboratorio de Analítica de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

El grado de hinchamiento se determinó gravimétricamente a distintos tiempos. Una vez conocido el peso de la esponja seca (W_{dry}) fue sumergido en una solución buffer de fosfato (PBS) 0.1 M, pH 7, a 37° C. El exceso de PBS fue removido por un papel de filtro previamente humedecido en la misma solución, luego cada muestra de esponjas hidratada fue pesada (W_{wet}). El peso de PBS absorbida fue controlado en los siguientes tiempos: 10' - 20' - 30' - 1h - 2h - 4h y 6h. (Ecuación 5)

$$G = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

G: Hinchamiento promedio

W_{wet} : Peso hidratado de la esponja

W_{dry} : Peso seco de la esponja

3.9.4 Biocompatibilidad de las esponjas de quitosano

Se realizó en el Bioterio y Sala Quirúrgica del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto de Salud del Niño.

Para la realización de esta prueba se utilizaron de Esponjas de Quitosano/TCP entrecruzadas y no entrecruzadas.

Este test se realizó en ratas Holtzman tomando como especificaciones la norma ISO 10993-6⁹¹

Se utilizó 22 ratas machos de 250 a 300 g de peso, tendrán una dieta balanceada con alimento elaborado en la UNALM, a base de maíz, afrecho, soya, entre otros.

Los 22 animales fueron distribuidos en jaulas de malla metálica a razón de 4 y 3 ratas por jaula. A cada uno de los animales se le colocó un tipo de implante a cada lado del lomo: esponja de quitosano/TCP y esponja de quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio.

Los animales fueron divididos en forma aleatoria en 2 grupos (de 11 animales por grupo), de acuerdo al periodo de tiempo en que fueron sacrificados:

Grupo I: Sacrificio y evaluación histológica a los 7 días.

Grupo II: Sacrificio y evaluación histológica a los 21 días.

Los implantes de quitosano se prepararon de la siguiente manera: las esponja de quitosano/TCP y esponja de quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato de calcio fueron cortadas con medidas de 5x5 mm para su posterior empaquetado y esterilización con oxido de etileno en el Servicio de Esterilización del Instituto Especializado de Salud del Niño.

En el día de la realización de la prueba se rasuró el lomo de cada rata con una navaja, y luego fue desinfectado con etanol 70°.

Los animales fueron anestesiados con una solución salina de Ketamina (50-100 mg/kg) y Xilacina (1-5 mg/kg), con una jeringa hipodérmica. Luego se procedió a limpiar y desinfectar el área de trabajo con la ayuda de alcohol yodado y gasas estériles. Se realizó una incisión de 1,5 cm. de longitud a cada lado del lomo, se procedió a desbridar, las esponjas fueron colocadas en el tejido celular subcutáneo. Después de cada implantación cada rata fue devuelta a su respectiva jaula hasta la fecha de sacrificio. El total de implantes que serán colocados será 44.

Una vez cumplidos los periodos experimentales de 7 y 21 días, los animales fueron sacrificados por sobredosis de Ketamina y Xilacina. Inmediatamente después se procedió a la recuperación de los implantes, realizando una biopsia en bloque de los tejidos que lo contengan con la ayuda de una hoja de bisturí N° 15 en un mango N° 3 y pinzas de disección, con un margen de seguridad de 1cm en todas las direcciones. Las muestras fueron identificadas y luego colocadas en solución acuosa de formol al 10% para su fijación.

Las observaciones histológicas de los cortes efectuados a cada animal fueron realizadas con microscopio de luz, empleando aumento de 40X para la evaluación, por un patólogo que permanecerá ciego con respecto a las intervenciones quirúrgicas (implantes) colocados en el lomo de rata. Las observaciones se realizarán en base a cambios cuantitativos predominantes de la zona adyacente a las esponjas. Luego se determinará la intensidad de la reacción inflamatoria, tipificándolo como reacción inflamatoria de tipo aguda o crónica. (Anexo 3)

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Todos los datos de las pruebas realizadas, se calcularon usando el promedio como medida de la tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión, presentándose como promedio \pm desviación estándar. Donde correspondía, la precisión de los resultados fue analizada mediante la determinación del coeficiente de variación (CV) que se calculó de acuerdo con la ecuación 6.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (6)$$

Donde:

CV = Coeficiente de Variación, %

S = Desviación estándar de la muestra

\bar{X} = Promedio de la muestra

Las diferencias entre grupos fueron comparadas utilizando el método de análisis one-way ANOVA del software ORIGIN. (Varianza *t de Student*, considerando un $p \leq 0,05$ como indicador de diferencias significativas)

IV. RESULTADOS

4.1. ESPONJAS DE QUITOSANO

Las esponjas de quitosano fueron suaves, compactas, homogéneas, de color crema y sin olor, las que tienen una estructura porosa tridimensional; con poros que crean una red interconectada a través de la matriz de quitosano/TCP.

Al comparar el pH de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas sin neutralizar y el pH de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas neutralizadas con la solución de NaOH encontramos que fueron significativamente diferentes. (*T-student*; $p \leq 0,05$; $n=3$)

El pH de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas sin lavar y el pH de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas lavadas con la solución de NaOH fueron significativamente diferentes. (*T-student*; $p \leq 0,05$; $n=3$)

El pH de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas lavada y el pH de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas lavadas fueron estadísticamente significativos. (*T-student*; $p \leq 0,05$; $n=3$)

Tabla 4.1. Mediciones del pH de las esponjas de quitosano

MEDICION	ESPONJAS SIN NEUTRALIZAR		ESPONJA NEUTRALIZADA	
	S/E	E	S/E	E
1	3.2	3.6	5.57	6.85
2	3.2	3.5	5.53	6.9
3	3.3	3.5	5.55	6.87
PROMEDIO	3.23	3.53	5.55	6.87
DESVEST	0.06	0.06	0.02	0.03
CV	1.79	1.63	0.36	0.37

El tratamiento de las esponjas con una solución de NaOH las hizo insolubles en agua debido a la neutralización del grupo amino protonado del quitosano formando la base libre de quitosano insoluble y la sal sódica de lactato.

El espesor de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzada y esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas sin neutralizar son 0.4887 y 0.4748 respectivamente.

El espesor de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzada y esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas neutralizadas son 0.5032 y 0.4862 respectivamente.

Tabla 4.2. Mediciones del espesor (en mm) de las esponjas de quitosano

MEDICION	ESPONJAS SIN NEUTRALIZAR		ESPONJA NEUTRALIZADA	
	S/E	E	S/E	E
1	0.473	0.474	0.507	0.452
2	0.457	0.524	0.525	0.487
3	0.527	0.472	0.498	0.47
4	0.465	0.468	0.51	0.522
5	0.52	0.426	0.489	0.52
6	0.49	0.485	0.49	0.466
PROMEDIO	0.4887	0.4748	0.5032	0.4862
DESVEST	0.0292	0.0315	0.0137	0.0292
CV	5.9741	6.6336	2.7233	6.0073

4.2 EVALUACIÓN DE LAS ESPONJAS DE QUITOSANO

4.2.1 PRUEBAS MECÁNICAS

Alargamiento Porcentual

En la Tabla 4.3 y Figura 4.1 se muestran los resultados del A% en donde se puede comparar que las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas resultaron ser significativamente diferentes que las esponjas de quitosano/TCP entrecruzada con tripolifosfato dando valores de $12,58 \pm 0,96 \%$ y $10,28 \pm 0,61\%$ respectivamente (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=5$).

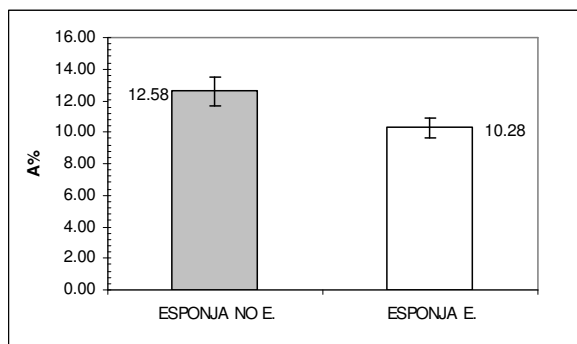


Figura 4.1. Alargamiento porcentual (A%) de las esponjas a una velocidad de 20 mm/min.

Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC)

En la Tabla 4.3 y la figura 4.2 se muestran los resultados del ETC en donde se puede apreciar que las esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas resultaron ser significativamente diferente a las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas, registrando valores de ETC de $7.78 \pm 0,51 \text{ Nmm}^{-2}$ y $5,77 \pm 0,34 \text{ Nmm}^{-2}$ respectivamente (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=5$).

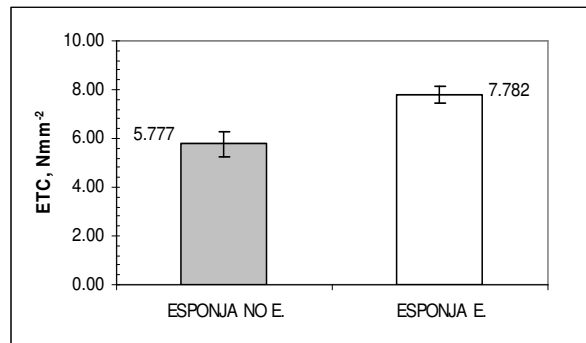


Figura 4.2. Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) de las esponjas a una velocidad de 20 mm/min.

Tabla 4.3. Resultados de las pruebas mecánicas realizadas a las diferentes esponjas

MUESTRA	ESPONJA NO ENTRECruzADA		ESPONJA ENTRECruzADA	
	A %	ETC (N/mm ²)	A %	ETC (N/mm ²)
1	12.000	6.26	10.400	7.35
2	12.600	6.34	10.100	8.07
3	11.800	5.75	11.200	8.20
4	12.300	5.26	10.200	7.71
5	14.200	5.27	9.500	7.59
PROMEDIO	12.580	5.777	10.280	7.782
DESVEST	0.955	0.517	0.614	0.349
CV	7.591	8.957	5.973	4.485

4.2.2 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PORO

La superficie de cada tipo de esponja fue densa (anexo 3) y altamente porosa, su estructura porosa puede ser cambiada de acuerdo al tipo de preparación.

De este estudio surgen dos interesantes observaciones. La primera, hay una clara diferencia entre la estructura “fibrilar” de las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas y la estructura en “caja de huevo” de la esponja de quitosano/TCP entrecruzada que da una apariencia de ordenamiento de la red polimérica. Y la segunda es el tamaño de poro y la porosidad que varía por el grado de entrecruzamiento, tal como se observa en la tabla 4.4.

En la tabla 4.4 se muestran los resultados de la medición del tamaño de poro y la porosidad donde se obtuvo diferencia significativa entre las esponjas. (*T-student*; $p \leq 0,05$, $n=100$ para tamaño de poro y $n= 5$ para porosidad)

Tabla 4.4. Análisis microscópico de las diferentes esponjas

MUESTRA	PROMEDIO DEL TAMAÑO DE PORO (μ)	PROMEDIO DE LA POROSIDAD (%)
ESPONJA DE QUITOSANO /TCP ENTRECruzADA	117.4	82.3
ESPONJA DE QUITOSANO /TCP NO ENTRECruzADA	202.7	78.0

4.2.3 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HINCHAMIENTO

El hinchamiento de ambas esponjas presenta diferencias significativas entre una y otra, tal como se observa en las tablas 4.5 y 4.6 y la figura 4.3, en donde la esponja entrecruzada presenta una menor absorción de la solución buffer debido a que el entrecruzamiento otorga a las cadenas de quitosano enlaces de tipo covalente mas fuerte que las los enlaces iónicas que predominan en entre las cadenas de la esponjas no entrecruzada.

Cuando la esponjas están secas y comienza a absorber agua, las primeras moléculas que entran en la matriz hidrataran los grupos polares hidrofílicos, encabezando el “agua ligada primaria” es por eso que en el gráfico 4.6 se observa una rápida absorción de la solución buffer en los primeros minutos como consecuencia de que las cadenas de quitosano posee grupos hidrófilos como el NH_2 .

Luego de absorber agua e hincharse deja expuesto grupos hidrofóbicos, que también interaccionan con las moléculas de agua, llevando agua hidrofóbicamente ligada o “agua ligada secundaria” tal como se puede apreciar en el grafico 4.3 a partir de 1 hora hasta 2 horas después de estar sumergidas en la solución buffer; después de una rápida absorción viene una etapa de reposo en la que se van exponiendo los grupos hidrofóbicos y van interaccionando con las moléculas de agua a través de enlaces débiles, hasta llegar a absorber el máximo de agua.

Tabla 4.5. Resultado de la prueba de hinchamiento realizada a las esponjas entrecruzadas

Tiempo de Hidratación (en min.)	10	20	30	60	120	240	360
Peso Inicial (en gramos)	0,0421	0,0386	0,0338	0,0410	0,0325	0,0327	0,0327
Peso Final (en gramos)	0,2130	0,2016	0,1598	0,1924	0,1977	0,1932	0,1938
Hinchamiento promedio %	405,94	422,28	372,78	369,27	508,31	490,83	492,66

Tabla 4.6. Resultado de la prueba de hinchamiento realizada a las esponjas no entrecruzadas

Tiempo de Hidratación (en min)	10	20	30	60	120	240	360
Peso Inicial (en gramos)	0.0282	0.0246	0.0246	0.0253	0.0271	0.0271	0.0239
Peso Final (en gramos)	0.3756	0.351	0.3426	0.3654	0.4468	0.4926	0.4323
Hinchamiento promedio %	1231.91	1326.83	1292.68	1344.27	1548.71	1717.71	1708.79

El agua ligada primaria y secundaria son a menudo combinado y simplemente llamadas “agua ligada total”. Después que los enlaces polares e hidrofóbicos han interaccionado con las moléculas de agua ligada, la esponja puede embeberse con agua adicional, debido a fuerzas osmóticas de las cadenas de esponjas de quitosano hacia su infinita dilución.

Al compara ambas esponjas de quitosano/TCP se encontró diferencia significativa. (*T-student*; $p \leq 0,05$, $n=1$)

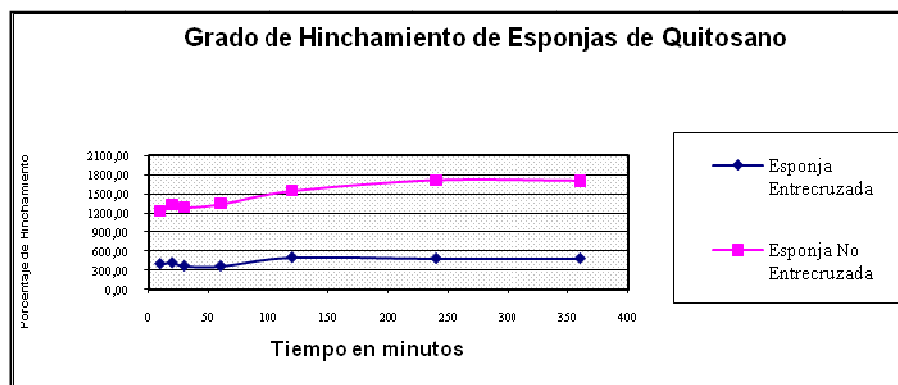


Figura 4.3. Curva de hinchamiento de ambas esponjas de quitosano /TCP

4.2.4 PRUEBA DE BIOCOMPATIBILIDAD

Esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas (EE) y no entrecruzadas (ENE) fueron implantadas en el lomo de ratas Holtzmann, los resultados se muestran en la tabla 4.7 y 4.8 respectivamente.

Después de 7 días de la implantación de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzada y no entrecruzada se observó una zona con exudado inflamatorio alrededor de ambos tipos de esponjas. En el exudado se observa abundantes polimorfos nucleares, neutrófilos y en algunos casos células gigantes a cuerpo extraño, que aparecen encapsulando las esponjas. (anexo 5)

En el primer grupo de las esponjas no entrecruzadas, existe una respuesta exacerbada hacia la esponja de quitosano no entrecruzada; en nueve de las muestras empleadas se observa una inflamación severa con focos de hemorragia y en algunos casos necrosis. En la observación de la corona inflamatoria aguda severa se nota que el proceso de inflamación crónica empieza a formarse periféricamente.

Tabla 4.7. Resultados de la prueba de biocompatibilidad
tiempo de evaluación histológica: 7 días

TIPO DE INFLAMACIÓN	ENE	EE
Ausencia de Inflamación	-	-
<i>Aguda Leve</i>	-	-
<i>Aguda Moderada</i>	-	2
<i>Aguda Severa</i>	9	5
<i>Crónico Leve:</i>	2	-
<i>Crónico Moderado</i>	-	4

En el primer grupo de esponjas entrecruzadas, no existe una predominancia de algún tipo de inflamación; lo que en mayor número se encuentra es la inflamación aguda severa. Se observa también focos de necrosis y periféricamente a la corona inflamatoria aguda la formación de la reacción crónica con presencia de escasos fibroblastos, linfocitos y células plasmáticas. Luego tenemos cuatro muestras con infiltrado crónico leve donde se observa células gigantes a cuerpo extraño, abundantes linfocitos y empiezan la migración de fibroblastos

Después de 21 días de implantación de las esponjas de quitosano/TCP entrecruzada y no entrecruzada, y escaso tejido de granulación con aumento de la vascularidad. La mayoría de muestras de las esponjas entrecruzadas y en menor cantidad las esponjas no entrecruzadas, tuvieron una delgada zona de exudado inflamatorio crónico. El edema desapareció y se presentó proliferación y migración de fibroblastos dentro de la esponja con formación de colágeno entre las trabéculas de la esponja. Se observa también neoformación de vasos sanguíneos con escasa infiltración mononuclear; estas células son visibles dentro de la esponja. (anexo 5)

En el segundo grupo de las esponjas no entrecruzadas tampoco se observa un predominio de algún tipo de inflamación. Tenemos dos cosas importantes; la primera es que tenemos cuatro muestras con inflamación crónica leve y dos con moderada en las cuales se empieza a observar un encapsulamiento de la esponja por un tejido fibroso formado por los fibroblastos presentes en la corona inflamatoria crónica. Lo segundo resaltante es la ausencia de inflamación en una de las muestras.

Tabla 4.8. Resultados de la prueba de biocompatibilidad
tiempo de evaluación histológica: 21 días

TIPO DE INFLAMACIÓN	ENE	EE
Ausencia de Inflamación	1	3
Crónica Leve	6	7
Crónica Moderada	-	-
Crónica Severa	-	-
Aguda Severa	2	1
Aguda Moderada	2	-

En el segundo grupo de las esponjas entrecruzadas; lo que predomina, y se encuentra en siete de las muestras, es la inflamación crónica leve en la cual se observa una corona inflamatoria delgada con abundancia de fibroblastos y colágeno formado alrededor de la esponjas. Además se observa fibroblastos dentro del trabeculado de las esponjas con formación de colágeno dentro de la esponja que es una diferencia encontrada entre las esponjas no entrecruzadas donde la formación de colágeno se limita a la periferia de la esponja.

Al evaluar estadísticamente las esponjas de quitosano/TCP no entrecruzadas y entrecruzadas a los 7 y 21 días se encontró que existe diferencia significativa entre ambos tipos las esponjas. (*T-student*; $p \leq 0,05$, $n=11$)

V. DISCUSIÓN

5.1 Esponjas de Quitosano

Las características organolépticas de las esponjas de quitosano/TCP son importantes pues nos aseguran la calidad y confianza del material elaborado para ser usado en aplicaciones biomédicas.

Las esponjas de quitosano/TCP entrecruzadas fueron mejor aceptadas por el medio fisiológico debido a que poseen pH similar a este medio. El pH de las esponjas no entrecruzadas tiene un valor menor que las esponjas entrecruzadas.³⁰

Se observó aceptabilidad de ambas esponjas por parte del medio fisiológico, esto debido a que el quitosano es un polímero lineal de propiedades catiónicas, que a un pH de alrededor de 6.5 mantiene una carga positiva, esta carga positiva le confiere la capacidad de adherirse a materiales cargados negativamente como superficies celulares.

5.2 Propiedades Mecánicas

Las esponjas analizadas presentaron un comportamiento mecánico gobernado por la ley de *Hooke* (ver figura 3.2), es decir, presentaron una zona de deformación elástica, seguida por una zona de alargamiento de la película en donde la carga se mantiene constante, esta es la zona de deformación irreversible o plástica, luego de la cual sigue la ruptura de la esponja.⁹³

Esto debido a que se forma enlaces de tipo covalente entre las cadenas del polímero. Esto quiere decir que la esponja de quitosano posee una maleabilidad que le permite amoldarse a la forma donde se implante.

La diferencia en la propiedades mecánicas entre los dos tipos de esponjas de quitosano/TCP es debido a la presencia del agente entrecruzante en la esponja entrecruzada, otorgándole a esta misma una mayor resistencia en desmedro de su elasticidad.

Existe información sobre las propiedades mecánicas de diferentes materiales compuestos de quitosano, mostrando diferencias entre investigaciones anteriores, debido no solo a las propiedades del quitosano como son el peso molecular o grado de deacetilación, sino que también al proceso de fabricación de los materiales, las condiciones ambientales y la velocidad de análisis.^{3, 4, 15, 16, 27}

5.3 Determinación del tamaño de poro

El promedio del tamaño de poro, la distribución del poro, y la interconexión entre poros son factores importantes de una esponja o andamiaje, que son a menudo de difícil cuantificación y son incluidos dentro de un parámetro llamado “porosidad”. La clave de los factores que controlan el tamaño de poro, la porosidad y las interconexiones son la composición de la red de cadenas poliméricas y la densidad de entrecruzamiento.

Los poros fueron formados por liofilización, sin el uso de algún agente porógeno, los cristales de hielo formados cuando se congeló la muestra fueron usados como agente porógeno. La técnica de liofilización crea una microestructura porosa abierta con un alto grado de interconectividad.²⁴ La morfología de las esponjas fue influenciada por el entrecruzamiento y puede ser modificada también por la temperatura de congelación.

El tamaño de poro y la porosidad son elementos indispensables de la actividad biológica de los biomateriales, por que ellos permiten la migración y proliferación de células así como la vascularización.

Existen investigaciones donde se ha trabajado con un rango de tamaño de poro de 45 μ m – 600 μ m y 62% - 90% de porosidad para polímeros naturales.^{2, 13, 15, 24, 94.}

5.4 Determinación del grado de hinchamiento

El hinchamiento, habilidad de un material a retener agua, es importante para la absorción de fluidos del cuerpo y para la transferencia de nutrientes celulares y metabolitos a través del material.

La hidrofilia de las esponja entrecruzadas y no entrecruzadas, es debido a los grupos –OH y –NH₂. En los polímeros no entrecruzados existe un entramado de origen físico (no permanente), puesto que las cadenas se enredan unas con otras en una maraña tridimensional que puede albergar y retener moléculas de líquido.

La diferencia que se encontró entre esponjas entrecruzadas y no entrecruzadas reside en que, en los primeros, la entrada de líquido no puede separar las cadenas por estar covalentemente unidas mientras que en los segundos, la entrada de líquido puede desenmarañar las cadenas, separándolas, debido a que las fuerzas que las mantienen unidas son de origen físico. La estructura entrecruzada es insoluble mientras que la

no entrecruzada puede disolverse. La entrada de líquido en el interior esponja alcanza un límite o grado máximo de hinchamiento, ya que la estructura covalente no puede deformarse indefinidamente. Por el contrario, el hinchamiento de una esponja no entrecruzada carece de límite, puesto que la incorporación progresiva de líquido puede conducir a la disolución de la misma.^{11, 95, 96}

El entrecruzamiento en las esponjas es debido no solo a uniones covalentes (enlaces sigma), típicas de cualquier material entrecruzado sino también a fuerzas intermoleculares de Van der Waals y a los enlaces de hidrógeno.⁹⁶

La relación de entrecruzamiento es uno de los factores más importantes que afectan al hinchamiento de las esponjas y se define como la relación entre los moles de agente entrecruzante y los de las unidades repetidas de monómero. A mayor entrecruzamiento, mayor cantidad de agente entrecruzante es incorporado en la estructura de la esponja. Las esponjas muy entrecruzadas tienen una estructura más compacta y se hinchan mucho menos comparándolos con el mismo hidrogel con un entrecruzamiento menor. El entrecruzamiento dificulta la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo así el hinchamiento.⁹⁶

Los materiales que absorbe fluido de 80 veces su peso inicial son suficientes para ser usado como biomaterial en ingeniería de tejidos^(13, 26).

5.5 Prueba de biocompatibilidad

Después de 7 días de implantación se observaron polimorfonucleares, indicando una reacción inflamatoria hacia el implante, estos polimorfonucleares estuvieron presentes en el tejido circundante y dentro de la esponja. Los vasos sanguíneos neo formados fueron vistos rodeando la zona inflamatoria, pero no dentro.

Interesantemente, células gigantes fueron observadas 7 días después de implantado la esponja indicando una posible reacción a cuerpo extraño.

Esto ocurre por que el quitosano promueve la migración de células inflamatorias que son capaces de producir y secretar productos proinflamatorios y factores de crecimiento en una fase de curación muy temprana^(9, 18).

Topográficamente, la superficie de la esponjas de quitosano no es lisa y puede provocar fácilmente este tipo de reacción. Además es conocido que el quitosano puede atraer neutrófilos y activar macrófagos.⁽¹³⁾

El quitosano acelera la migración de PMN hacia el área de implantación; estos PMN activados secretan los mediadores inflamatorios como el factor de necrosis de tumoral (TNF), interleucinas (IL-1, IL-8, IL-12) y proteína inflamatoria de macrófago (MIP)-1a y MIP-1b ^(9, 94, 95).

En la mayoría de especímenes de 21 días de implantación, la reacción fue pasajera y limitada al área alrededor de la esponja implantada. Los granulocitos necrosados y el infiltrado inflamatorio casi desaparecen.

El quitosano esta compuesto por unidades de N-glucosamina y N-acetil-glucosamina. Los macrófagos parecen expresar receptores para manosa y glicoproteínas de N-acetil-glucosamina, los cuales median la captación de estas glicoproteínas en el macrófago ⁽⁹⁶⁾.

Se piensa que el enlace de la N- acetil-glucosamina a los receptores específicos del macrófago es un requisito para mejorar la activación del macrófago, el cual juega un papel importante en los procesos de curación. ⁽⁹⁶⁾

Además se observó abundante tejido fibrótico alrededor de la esponja no entrecruzada y alrededor y dentro de la esponja de quitosano entrecruzada.

La granulación producida por las esponjas de quitosano entrecruzadas fue más acelerada y la cantidad de colágeno fue mayor que las esponjas de quitosano no entrecruzadas. La nueva formación de tejido conectivo mas la proliferación de fibroblastos y la síntesis de matriz extracelular es un efecto del quitosano sobre el tejido circundante ^(9, 97).

VI. CONCLUSIÓN

Es importante neutralizar las esponjas de quitosano/TCP hasta llevarlo a un pH que pueda ser tolerado y donde material no pierda su potencial de acción.

Las propiedades mecánicas demostraron que ambas esponjas de quitosano/TCP están consideradas dentro de la clasificación de materiales blandos por lo tanto estas esponjas van a poder ser manipuladas.

La porosidad y el tamaño de poro demostraron ser efectivas al momento de servir como un sistema de andamiaje para la proliferación celular y la neo formación de vasos sanguíneos.

El hinchamiento que presentaron los materiales permite afirmar que poseen una buena perfusión, necesarios para la proliferación y nutrición celular.

Las propiedades mecánicas de hinchamiento y de superficie pueden ser manipuladas por la adición y concentración del agente entrecruzante.

La aceptabilidad biológica a las esponjas de quitosano fue mas rápida en las esponjas/TCP entrecruzadas al observarse que la células migraron al interior de estas inclusive con formación de colágeno por lo tanto se demuestra así la biocompatibilidad de las esponjas de quitosano.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar la fabricación del material con otros tipos de quitosano.
2. Realizar estudios empleando otros tipos de agente entrecruzante y adicionando algunos fármacos.
3. Realizar la prueba biológica en una población más sensible.
4. Trabajar la prueba de biocompatibilidad con más días de implantación.
5. Continuar la investigación utilizando este estudio como base para investigar la liberación de fármacos y biodegradación de la esponja de quitosano.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Seon Cho, Ran Hong, Moo Lee. Study in gelatin containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel Gelatin-Alginate sponge. *Biomaterials* 20(1999) 409-417.
2. Sundararajan Madihaly, Howard Matthew. Porous chitosan scaffolds tissue engineering. *Biomaterials* 20 (1999) 1133-1142.
3. Caren C. Leffer, Bernd W. Muller. Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges. *International Journal of Pharmaceutics* 194(2000) 229-237.
4. Tanveer A. Khan, Kok K. Peh. Mechanical bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2000 3(3): 303-311.
5. Fwu L. Mi, Shin S. Shyu. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 22(2001) 165-173.
6. Claire Chatelet, Odile Damour. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan film. *Biomaterials* 22 (2001) 261-268.
7. Jianbiao Ma, Hong Wang. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineered applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 22(2001) 331-336.
8. Pierre Sorlier, Anne Venuziere. Relation Between the degree of acetylation and the electrostatic properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* 2001, 2, 765-772.
9. H. Ueno, T. Mori, F. Toro. Topical formulation a wound healing application of chitosan. *Advanced Drugs Delivery Reviews* 52 (2001) 105-115.
10. ASTM. F 2103- 01 Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineering medical product applications. 2001
11. Hoffman Allan. Hidrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43 (2002) 3-12.

12. Taek W. Chung, Jun Yang. Preparation of alginate/galactosilated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials* 23(2002) 2827-2834.
13. Ehrenfreund-Kleinman, Z. Gazit. Synthesis and biodegradation of arabino-galactan sponges prepared by reductive amination. *Biomaterials* 23(2002) 4621-4631.
14. Trong-Ming, Chung Yang. Studies on the degradation behavior of chitosan –g-poly (acrylic acid) copolymers. *Tamkang Journal of Science and Engineering*. Vol 5, N° 4 (2002) 235-240.
15. Jin Shu Mao, Hai Feng. The properties of chitosan- gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* 24 (2003) 1621 – 1629.
16. Hui Ling, Asad Abu'Khalil. The preparation and characterization of drug-losaded alginate and chitosan sponges. *International Journal of Pharmaceutics* 251 (2003) 175 – 181.
17. Tanveer Ahmad, Kok Khiang. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *J Pharm Pharmaceutics Sci*. 6 (2003) 1: 20-26.
18. Sevdal Senel, Susan Mc Clure. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1467-1480.
19. J. Berger, M Rieist, J Mayer. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 19-34.
20. Nagwa Foda, Hanan El-Iathy. Optimization of biodegradable sponge as controlled release drug matrices. I. Effect of moisture level on Chitosan sponge mechanical properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 4 (2004) 369-379.
21. A. Babu, R. Panchagula. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *The AAPS Journal* 2004. 6 (3) articulo 27.
22. Shan-Hui Hsu, Shu Wen. Chitosan as scaffold materials: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Polymer Research* 11 (2004) 141-147.

23. S. Vasiliu, M. Popa, M. Rinaudo. Polyelectrolyte capsule made of two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal* 2005 article in press.
24. V. Karageorgiou, D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
25. Thomas Freier, Hui Shan Koh, Molly Schoichet. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26 (2005) 5872-5878.
26. Iyabo Adekogbe, Amyl Ghanem. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinken chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 7241-7250.
27. Yan Huang, Stella Onyeri, Sundararajan Madihally. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 7616-7627.
28. Wenling Cao, Mingyu, Cheng. Physical, mechanical and degradation properties, and Schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. *J Biomater. Sci. Polymer Edn.* 16 (2005) 6: 791-807.
29. R. Sastre, J. San Román. *Biomateriales*. CYTED. Faenza Editrice Iberica. 2004.
30. Ana Pastor. *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. Fondo Editorial PUCP, Lima, 2004.
31. Domszy, J. G. y G.F.A. Roberts. Evaluation infrared spectroscopic techniques for analyzing quitosano. *Makroml. Chem.* 186 (1985) 1671-1677.
32. G.F.A. Roberts. *Chitin Chemistry*. The Macmillan Press Ltda. Londres 1992.
33. P. Sandford A. Steiner. Biomedical application
34. R.A. Muzarelli, M. Mattioli. Medical and veterinary application of chitin and chitosan. Advance in chitin science. Vol II. A. Domard, G. Roberts, Eds. (Jacques Andre Publisher, 1997) pag. 580-589.
35. G. Skjak-Braek T. Anthonsen, P. Sandford. Biomedical applications of Chitin and its derivatives. Chitin and Chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical properties and applications. G. Skjak-Braek T. Anthonsen. P. Sandford. Eds. El sevier Applied Sci. Londres, 1989 p. 813-825

36. Y. Machida y T Nagai. Chitin/Chitosan as pharmaceutical excipients. *Topics in pharmaceutical science*. D.D. Breimer. D.J.A. Crommelin, K.K. Midha editores. La Haya 1989.
37. A. Singla, M. Charla. Quitosano: Some pharmaceutical and biological aspects an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001), 1047-1067.
38. S. Miyasaki, K. Ishii. The use of chitin and quitosano as drug carriers. *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981).
39. C.M. Lehr, J.A. Bowstra. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of quitosano and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* 8 (1997) 3: 316-322.
40. M.S. Rodríguez, V. Ramos. Preservación de membrillos con películas de quitosano. *Información Tecnológica* 9 (1998) 3: 129-134.
41. M.S. Rodríguez, V. Ramos. Preservación de tomates con películas de quitosano. *Información Tecnológica* 11 (2000) 2: 25-31.
42. A. Kungsuwan, B Itippong.- Chitin and Chitosan environmental friendly and versatile biomaterials. (Asian Institute of Tecnology, Bnagkok, 1996).
43. H. Strussczyk, H. Pospieszni y S. Kotlinski. Some new application of quitosano in agriculture. Chitin and Chitosan source, Chemistry, Biochemistry, Physical properties and applications. G. Skjak-Braek T. Anthonsen. P. Sandford. Eds. El sevier Applied Sci. Londres, 1989 p. 733-741.
44. W. A. Bough. *J Food. Sci.* 40 (1975) 297.
45. S. P. Meyers y H. No. *J. Food. Sci.* 54. (1989) 60.
46. C. Peniche Covas, W.Arguelles. Adsorption of mercuric ions by quitosano. *Appl. Polym. Sci.* 46 (1988) 982.
47. H. F. Mark, N. Bikales. Enciclopedia of polymer science and engineering. Vol. I. Wiley, New York. 1985 p. 20.
48. J. Ruiz Herrera. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. R. A. Muzarelli y E. Pariser. MIT Sea Grant Program, Cambridge, 1987.
49. S. Mima, M. Miya. Highly deacetylated quitosano and its properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 28 (1983) 1909-1917.
50. A. Domard y M. Rinaudo. Preparation and characterization of fully deacetylated quitosano. *Int. J. Biol. Macromol.* 5 (1983) 49-52.

51. T. Sannan, K. Kurita. Studies on chitin. Infrared spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer* 19 (1978) 458-459.
52. G. Moore, G. Roberts. Determination of the degree of N-acetylation of quitosano. *Int. J. Biol. Macromol.* 2 (1980) 115-116.
53. J.Brugnerotto, M. Rinaudo. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42 (2001) 3569-3580.
54. R. A. A. Muzarelli y R. Rochetti. Determination of the degree of acetylation of chitosans by firsts derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr. Polymer* 5 (1985) 461-472.
55. Lavertu, M.; Xia, A.; Serreqi, A.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Bushman, M.; Gupta, A. A Validated ¹H NMR method for the determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan, *J. Pharm. Biom. Research.* 32, 1149-1158 (2003).
56. R. A. A. Muzarelli. Chitin. Pergamon press, Oxford, 1977.
57. L. Raymond F. Morin. Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR. *Carbohydr. Res.* 246 (1993) 331-336.
58. P. Broussignac. Chitosan: a natural polymer not well know by the industr, Chimie e Industrie. *Genie Chimique* 99 (1968) 9. 1241-1247.
59. K. Varum, M. Anthonsen. Determination of the degree of N-Acetylation and the distribution of N-Acetyl groups in partially N-Desacetylated chitins by high-field NMR. *Carbohydr. Res.* 211 (1991) 1: 17-23.
60. Wei Wang, Shuqin Bo. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degree of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 13 (1991) 281-285.
61. Luis G. Parada e Issa Katime. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamerica de Polimeros* Volumen 5(1) 2004.
62. G. Lamarque, J. Lucas. Physicochemical behaviour of homogenous series of acetylated chitosans in aqueous solution. *Biomacromolecules* 6, 131-142. 2005
63. J. Kristl, J. Smid-Korbar, E. Strue, M. Schara, H. Rupprecht. Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carriers. *Int. J. Pharm.* 99 (1993) 13– 19.

64. J.K.F. Suh, H.W.T. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21 (2000) 2589–2598.
65. W. Wang, D. Xu, Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 16 (1994) 149–152.
66. P. Glerentes, L. Vachoud, J. Doury, A. Domard. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery, *Biomaterials* 23 (2002) 1295–1302.
67. G.A. Vikhoreva, E.A. Shablyukova, N.R. Kil'deeva. Modification of chitosan films with glutaraldehyde to regulate their solubility and swelling. *Fibre Chem.* 33 (2001) 206–210.
68. I. A. Alasarra, S. Bitegeri. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipasa-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials* 23 (2002) 3637–3644.
69. K. Tomihata, Y. Ikada. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials* 18 (1997) 567–575.
70. R. A. Muzzarelli. M. Kumar. Chitosan chemistry and Pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017–6084.
71. Y. Sawayanagi, N. Nambu. Directly compressed tablets containing chitin or quitosano in addition to lactose. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 2935–2940.
72. S. Miyasaki, K. Ishii. The use of chitin and chitosan as drug carriers. *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 3067–3069.
73. C. Tapia, E. Costa. Diseño de un sistema matriz de liberación prolongada base de quitosano de producción chilena. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 14 (1995) 3: 163–167.
74. J.F. Prudden, P. Migel, P. Hanson, L. Friedrich, L. Balassa. The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. *Am. J. Surg.* 119 (1970) 560–564.
75. R.A.A. Muzzarelli, M. Mattioli-Belmonte, A. Pugnali, G. Biagini. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing, in: P. Jolles, R.A.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1999, pp. 251–264.

76. H. Ueno, F. Nakamura, M. Murakami, M. Okumura, T. Kadosawa, T. Fujinaga. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* 22 (2001) 2125–2130.
77. Y. Suzuki, Y. Okamoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, S. Tanioka, Y. Shigemasa, S. Minami. Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation. *Carbohydr. Polym.* 42 (2000) 307–310.
78. Y. Shigemasa, S. Minami. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotech. Genetic Eng. Rev.* 13 (1995) 383–420.
79. F. Mi, Y. Wu, S. Shyu, A. Chao, J.Y. Lai, C. Su, Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *J. Membr. Sci.* 212 (2003) 237–254.
80. B.K. Choi, K.Y. Kim, Y.J. Yoo, S.J. Oh, J.H. Choi, C.Y. Kim, In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18 (2001) 553–557.
81. H. No, N. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72.
82. A. Begin, M.R.V. Calsteren. Antimicrobial films produced from chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 63–67.
83. M.A. Cassatella, The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today* 16 (1995) 21–26.
84. L. Di Pietro, Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells, *Shock* 4 (1995) 233–240.
85. V. Saez, E. Hernaez, L. Sanz. Liberación Controlada de Fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 4: 1* (2003).
86. D. Garcia, J. Escobar. Influencia del agente entrecruzante y la composición en hidrogeles de poli (ácido itacónico y ácido metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 4: 1* (2003).

87. J. Escobar, D. García, Issa Katime. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 3: 3 (2002).*
88. M.Faraldos. C. Goberna. Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid 2002.*
89. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res 1998; 39 (2):190–9.*
90. Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh WR. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res 2000; 15–22.*
91. ASTM E 258-67 (Reapproved 1987). Standard Test Method for Total Nitrogen in Organic Materials by Modified Kjeldahl Method. American Society for Testing and Materials, Estados Unidos. 311-313 (1987)
92. ISO 10993-6 Tests for Local Effects after Implantation.
93. Norma Oficial Chilena NCh1151.Of76. Láminas y películas plásticas. Determinación de las propiedades de tracción (1999).
94. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsurug. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res 1998; 39(2):190–9.*
95. J. Escobar, D. García, D. Zaldivar. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 3 julio 2002.*
96. Virginia Saez, Estibaliz Hernaez. Liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 4 enero 2003.*
97. M. Castella. L. Meda. Interleukin.I2 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Immunology. 25. 1995; 1-5*

IX. ANEXOS

ANEXO 1

ESQUEMA DEL ANALIZADOR DE TEXTURA

Esquema del analizador de textura utilizado en la medición de las propiedades mecánicas de las esponjas. El analizador corresponde a un equipo Lloyd, modelo LR5K de Lloyd Instruments, EE.UU (la imagen fue obtenida de la página web <http://www.lloyd-instruments.com>)

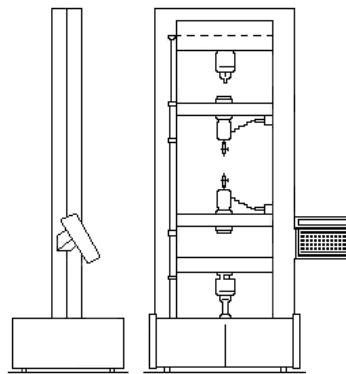
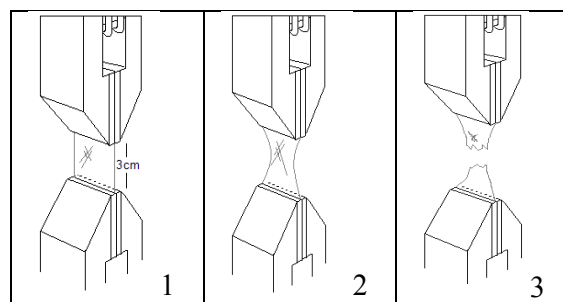


Diagrama de los ensayos mecánicos realizados a las esponjas. Las esponjas se colocan entre las mordazas (1). La mordaza superior tracciona la esponja a 20 mm/min (2) hasta su ruptura (3), momento en el que se determina el A% y el ETC.



ANEXO 2

ESPECIFICACIONES DEL ANALIZADOR DE TEXTURA

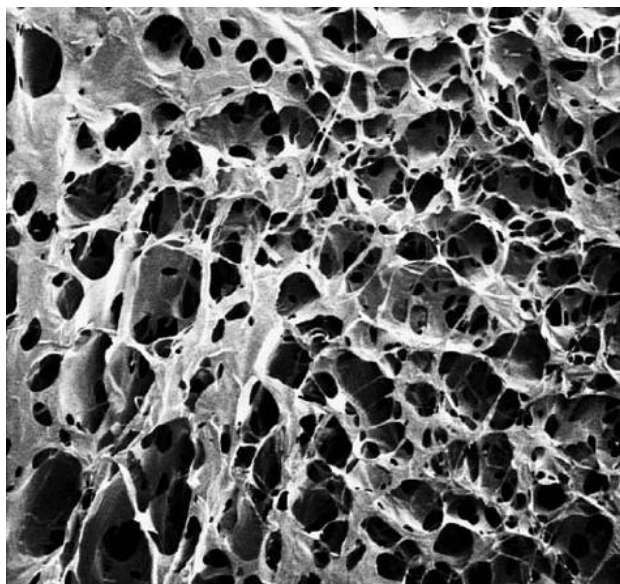
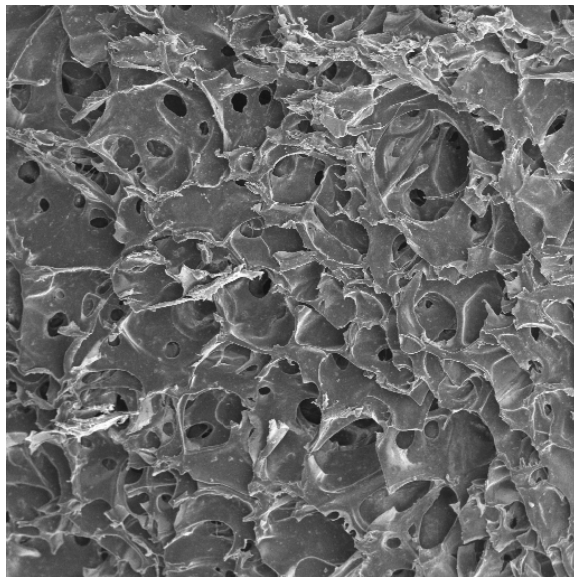
Especificaciones del Software DAPMAT 3.0			
Parámetro	Opción Elegida	Parámetro	Opción Elegida
<i>Tension / Compression</i>	Tension	<i>Load Cell</i>	5 kN
<i>Load Axis</i>	50 N	<i>Cell Class</i>	0.5
<i>Extensión Axis</i>	30 mm	<i>Statistics</i>	No
<i>Exit Limit 1</i>	0,0000 mm	<i>Parameters</i>	No
<i>Exit Limit 2</i>	30 mm	<i>Remarks</i>	No
<i>Gauge Length 1</i>	25 mm	<i>Auto Zero</i>	Off
<i>Break Detector</i>	Automatic	<i>Auto Return</i>	On
<i>Extensometer</i>	Internal	<i>Toe-In</i>	Off
<i>Test Speed</i>	20 mm/min ^a	<i>Stiffness Comp</i>	Off
<i>Jog Speed</i>	100 mm/min	<i>Simple Type</i>	Strip (tear) ^b
<i>No Samples</i>	10	<i>Dimension Type</i>	Area
<i>Lower Head Limit</i>	200 mm		

Ecuaciones para el cálculo de las pruebas mecánicas:

$A\% = \frac{D_f - D_i}{D_i} \times 100$	<p>A% = Alargamiento porcentual</p> <p>D_f = Distancia de alargamiento hasta el corte, en mm</p> <p>D_i = Distancia inicial de referencia, en mm</p>
$ETC = \frac{C_{MAX}}{A_R}$	<p>ETC = Esfuerzo de tracción en el corte, en Nmm⁻²</p> <p>C = Carga máxima de tracción en el corte de la esponja, en N</p> <p>A_R = Área transversal inicial del <i>film</i>, en mm²</p>
$A_R = \varepsilon \times A$	<p>A_R = Área transversal inicial de la esponja, en mm²</p> <p>ε = Espesor de la esponja, en mm</p> <p>A = Ancho de la esponja, en mm</p>

ANEXO 3

MICROESTRUCTURA DE LAS ESPONJAS DE QUITOSANO.



ANEXO 4

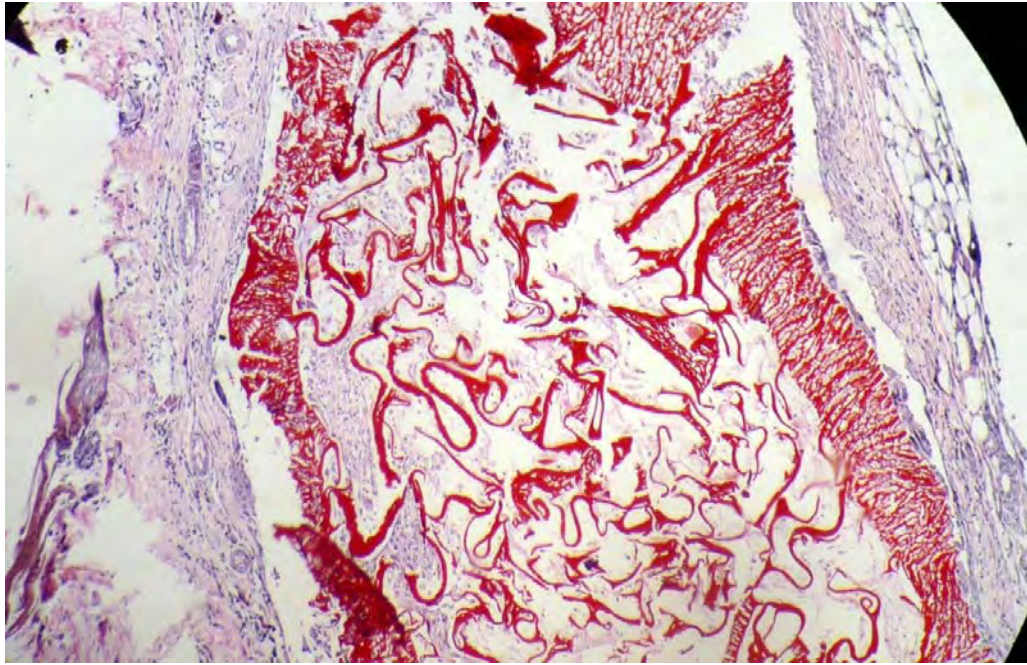
TABLA DE RECOLECCIONDE DATOS

1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN		
2. IMPLANTE UTILIZADO		
<i>Fecha de Colocación de Implantes:</i>		
3. TIEMPO DE EVALUACIÓN HISTOLÓGICA		
<i>Fecha de Sacrificio:</i>		
7 días		21 días
4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA (40X)		
<i>Fecha de Evaluación Histológica:</i>		
4.1. INFLAMACIÓN AGUDA	Esponja No Entrecruzada	Esponja Entrecruzada
<i>Ausencia de inflamación</i>		
<i>Inflamación Leve</i>		
<i>Inflamación Moderada</i>		
<i>Inflamación Severa</i>		
4.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA	Esponja No Entrecruzada	Esponja Entrecruzada
<i>Ausencia de inflamación</i>		
<i>Inflamación Leve</i>		
<i>Inflamación Moderada</i>		
<i>Inflamación Severa</i>		

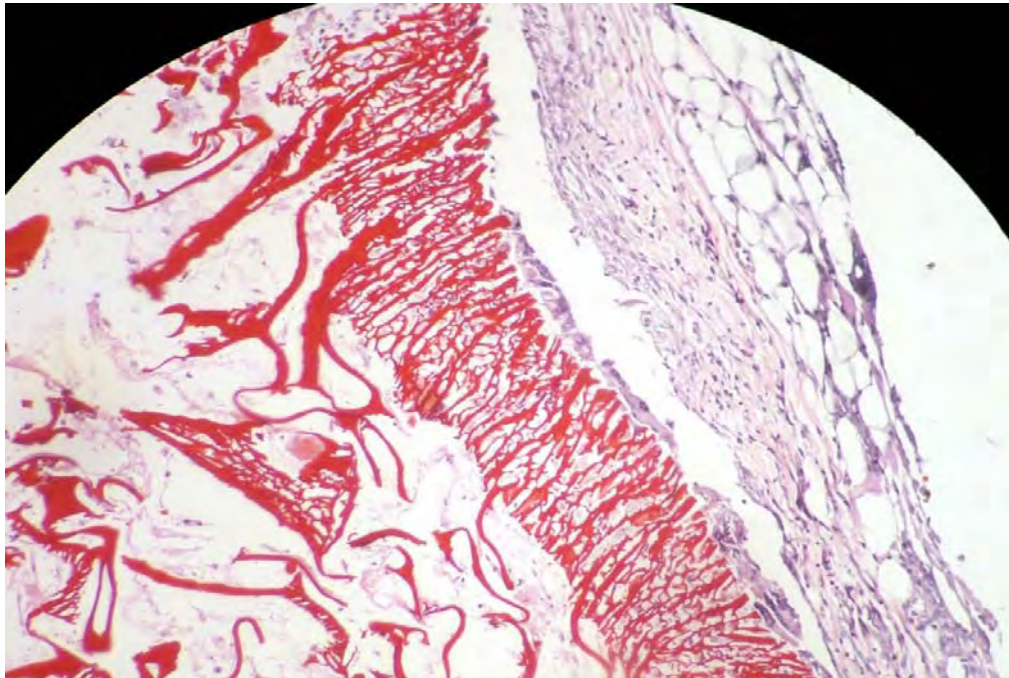
ANEXO 5

RESULTADOS DE LA LECTURA MICOROSCOPICA (COLORACIÓN H/E) **MUESTRAS DE 7 DÍAS DE IMPLANTACIÓN CON ESPONJAS DE** **QUITOSANO NO ENTRECruzADAS**

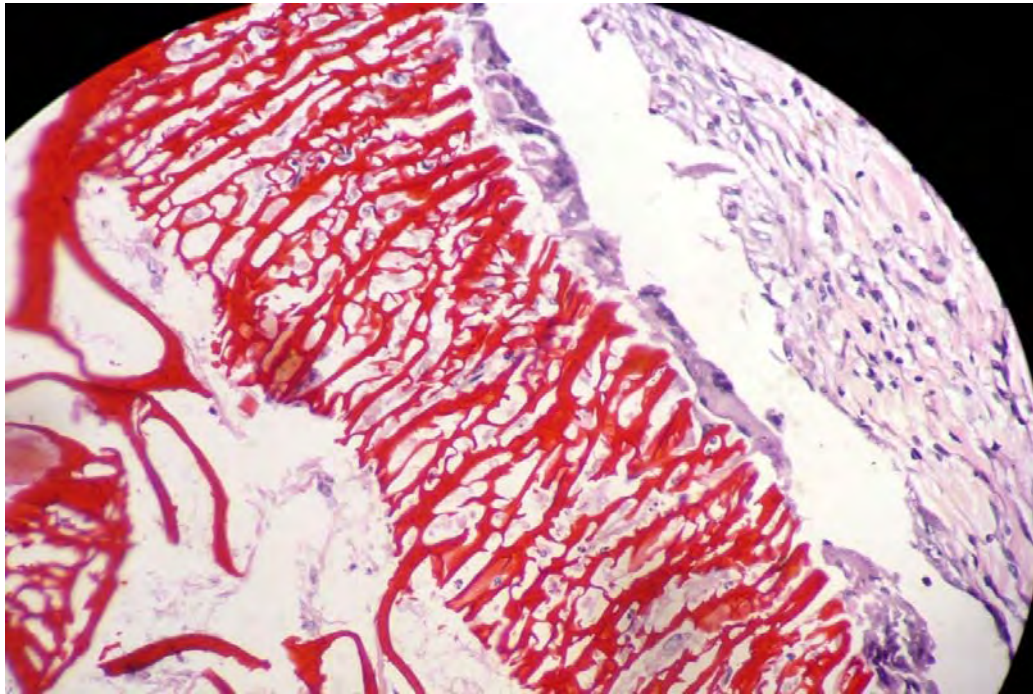
- A. Inflamación aguda severa, focos de hemorragia y zonas de necrosis.
- B. 10X: Inflamación crónica leve. Se observa la esponja de quitosano de color rojo, formación de fibrosis alrededor de la esponja.
20X: Se observa las paredes de esponja íntegras,
40X: Se observa migración celular dentro del trabeculado de la esponja, los fibroblastos sintetizan colágeno alrededor de las esponjas no entrecruzada.
- C. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja y se observa la corona de la inflamación crónica.
- D. Inflamación crónica leve, presencia de células gigantes, se observa las paredes de la esponja sin alteración.
- E. Inflamación aguda severa, rodeando a la esponja y se observa la corona de la inflamación crónica.
- F. Inflamación aguda severa, rodeando a la esponja y se observa la corona de la inflamación crónica.
- G. Inflamación aguda severa, rodeando a la esponja y se observa la corona de la inflamación crónica.
- H. Inflamación crónica leve predominantemente, inflamación aguda se ve en menor grado y formación de encapsulamiento de la esponja.
- I. 10X: Se observa una corona inflamatoria aguda severa rodeando a la esponja e invadiendo internamente al esponja.
20X: Se observa una zona basófila compuesta principalmente por polimorfonucleares.
40X: Se observa migración celular inflamatoria dentro del trabeculado de la esponja.
- J. Inflamación aguda severa, zonas de necrosis.
- K. Inflamación aguda severa, zonas de necrosis.



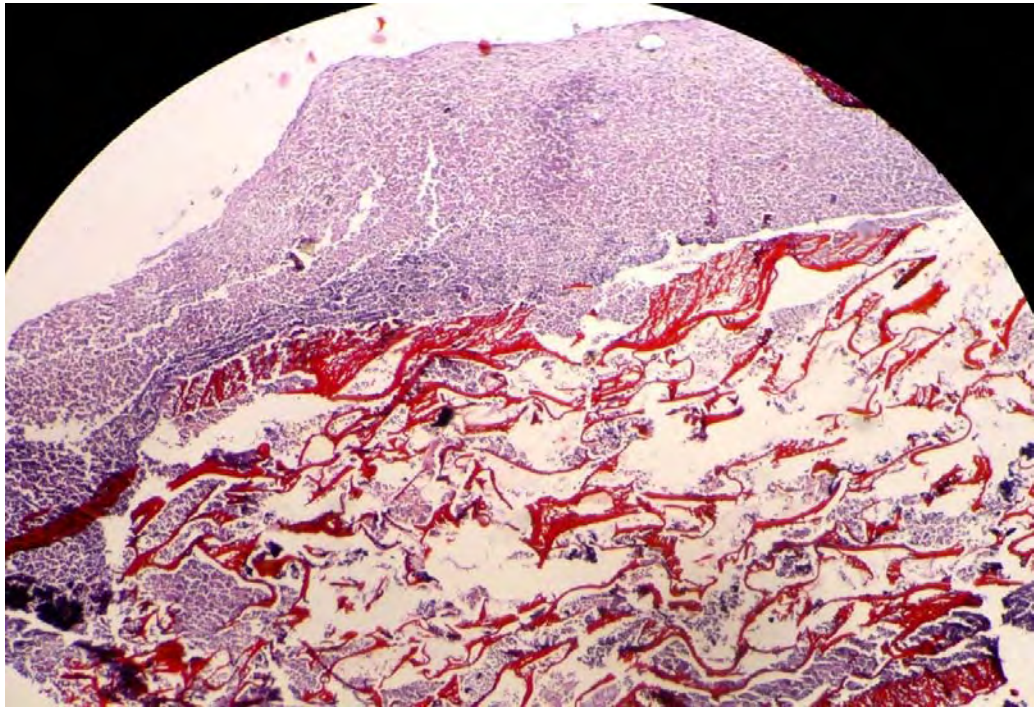
Microfotografía 10x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra B, coloración H/E).



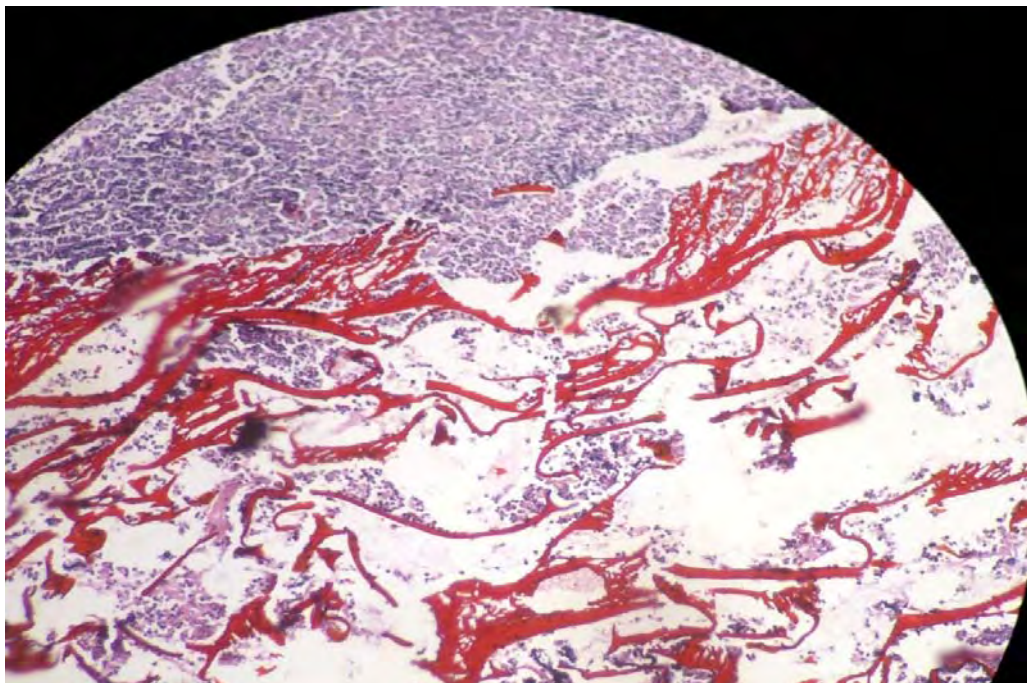
Microfotografía 20x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra B, coloración H/E).



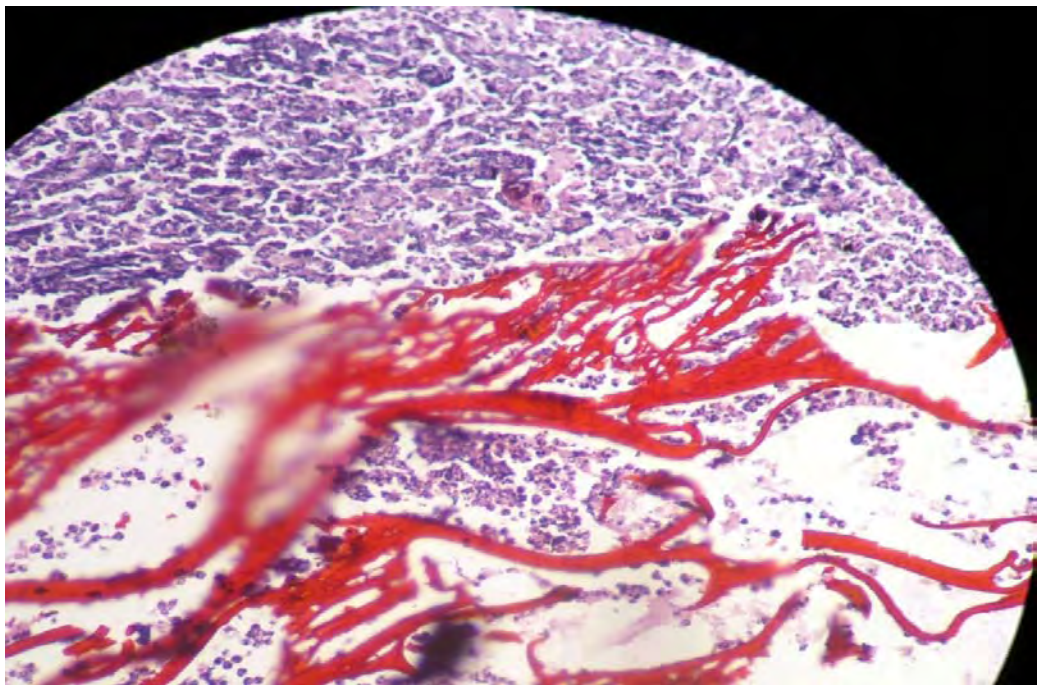
Microfotografía 40x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra B, coloración H/E).



Microfotografía 10x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).



Microfotografía 20x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).



Microfotografía 40x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).

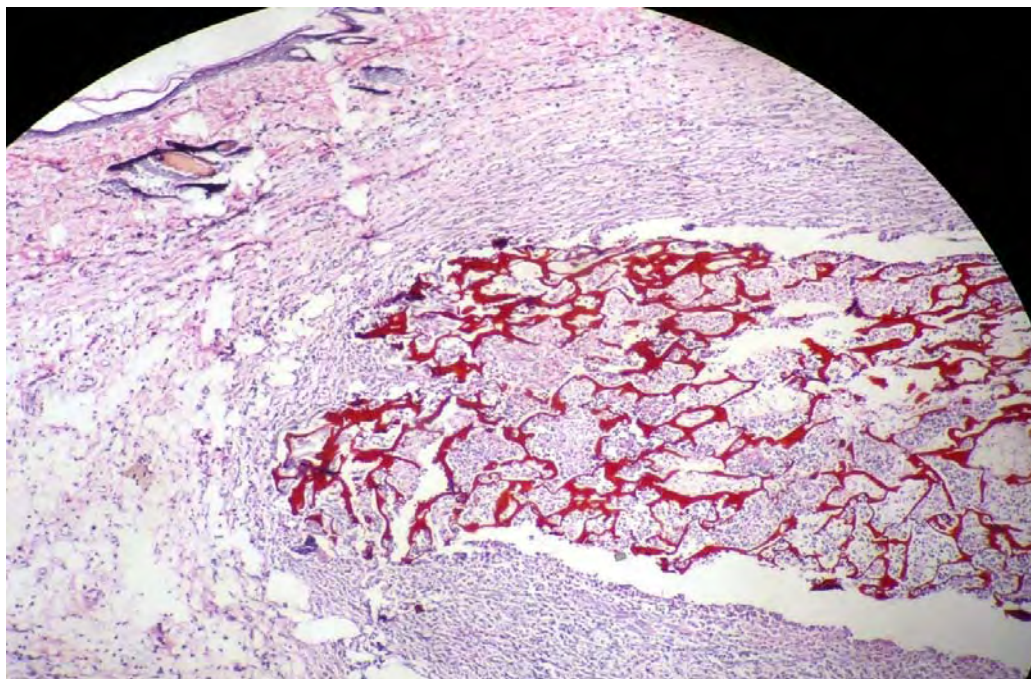
RESULTADOS DE LA LECTURA MICOROSCOPICA (COLORACIÓN H/E)
MUESTRAS DE 7 DÍAS DE IMPLANTACIÓN CON ESPONJAS DE
QUITOSANO ENTRECRUZADAS

- A. 10X: Se observa las paredes de la esponja de una forma irregular inflamación aguda moderada rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
20X: Se observa migración de células inflamatorias dentro de la esponja.
40X: Se observa abundantes polimorfonucleares y algunos neutrófilos.
- B. Inflamación aguda moderada rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- C. 10X: se observa claramente 2 coronas la mas externa corresponde a la corona inflamatoria crónica y la adyacente a la esponja es la corona inflamatoria aguda severa, con presencia de abundantes polimorfonucleares.
20X: Se observa inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
40X: Se observa abundantes linfocitos y neutrófilos dentro y fuera de la esponja de quitosano.
- D. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia
- E. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- F. Inflamación crónico moderada rodeando a la esponja, se observa formación de fibrosis en la periferia
- G. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- H. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- I. Inflamación crónico moderada rodeando a la esponja, se observa formación de fibrosis en la periferia
- J. 10X: Se observa la corona inflamatoria crónica moderada, dentro de la esponja se observa algunas zonas de necrosis con presencia de abundantes polimorfonucleares.

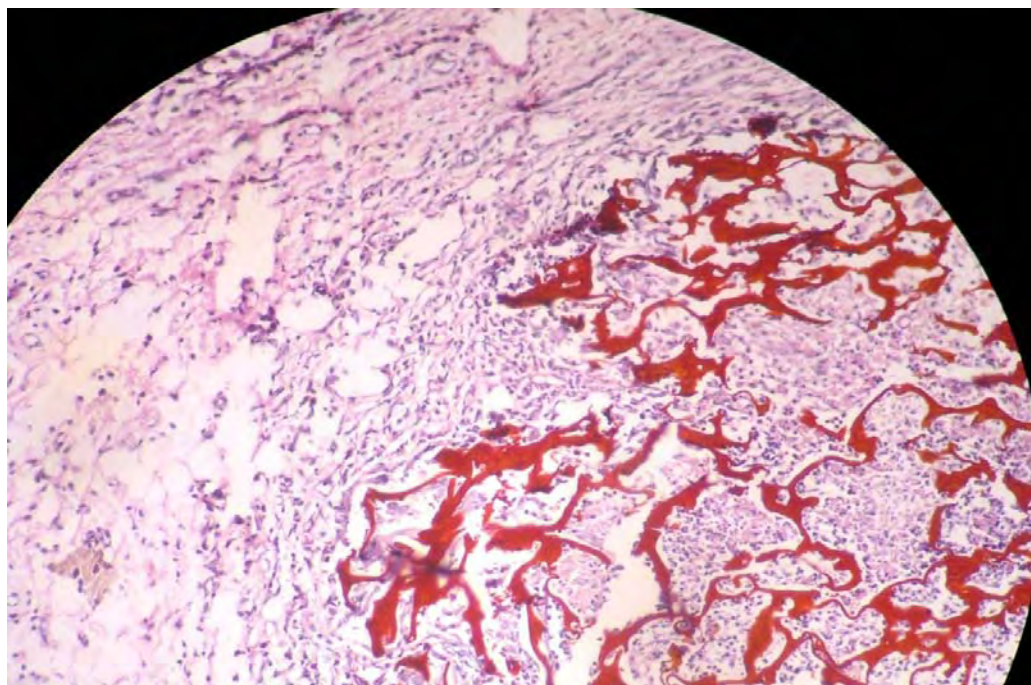
20X: Se observa migración de células a través de la pared de la esponja.

40X: Se observa migración celular dentro del trabeculado de la esponja, los fibroblastos sintetizan colágeno alrededor de las esponjas no entrecruzada

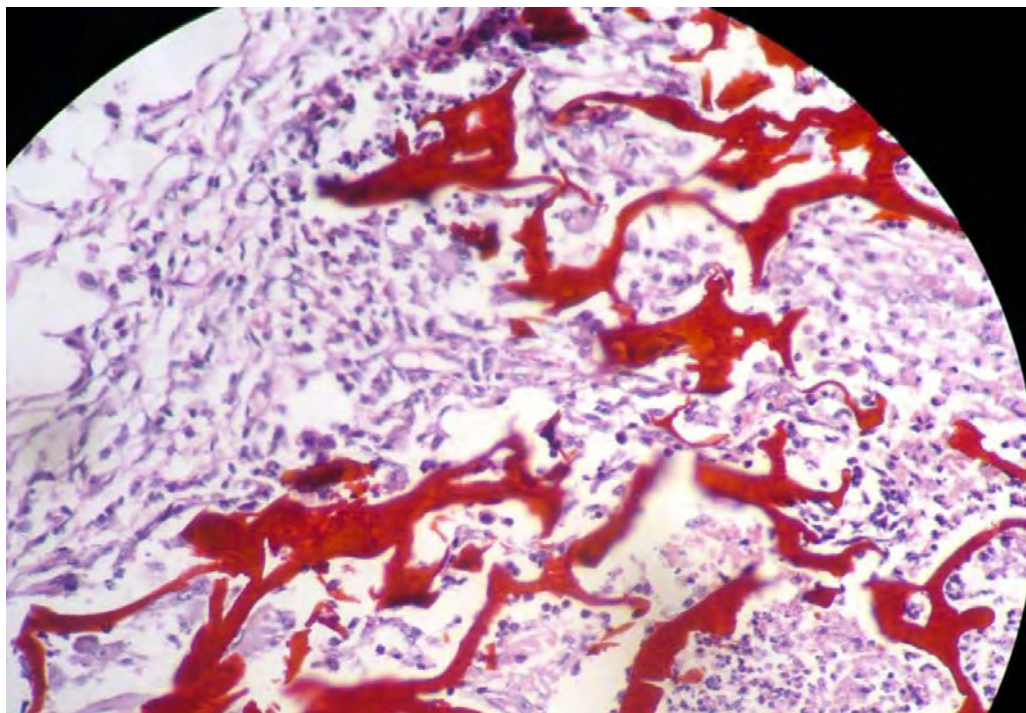
K. Inflamación crónica moderada rodeando a la esponja, se observa formación de fibrosis en la periferia.



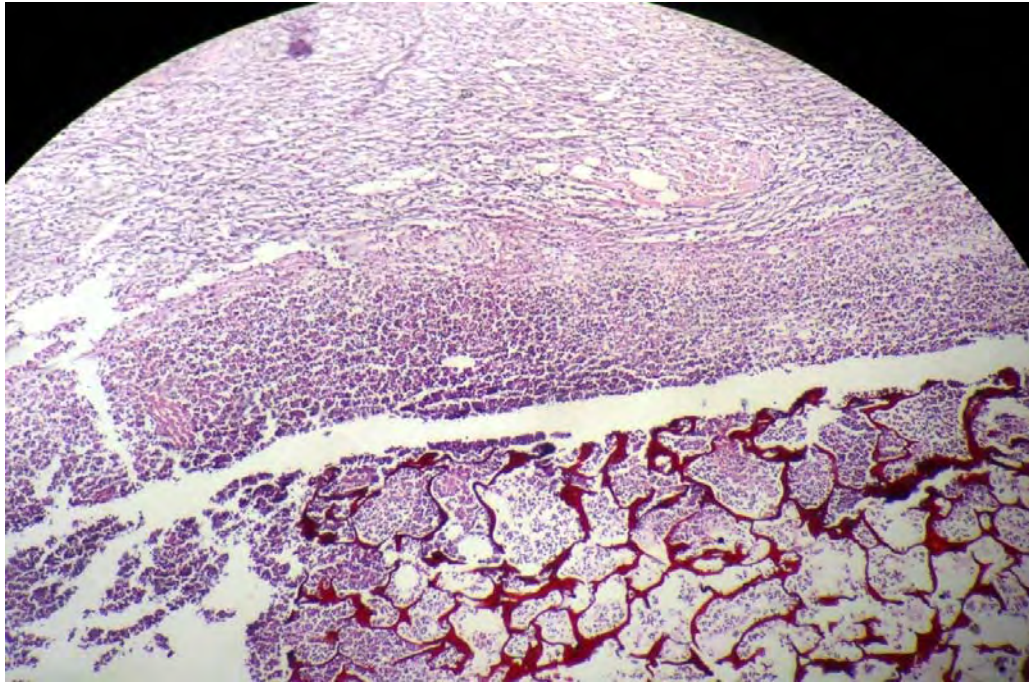
Microfotografía 10x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra A, coloración H/E).



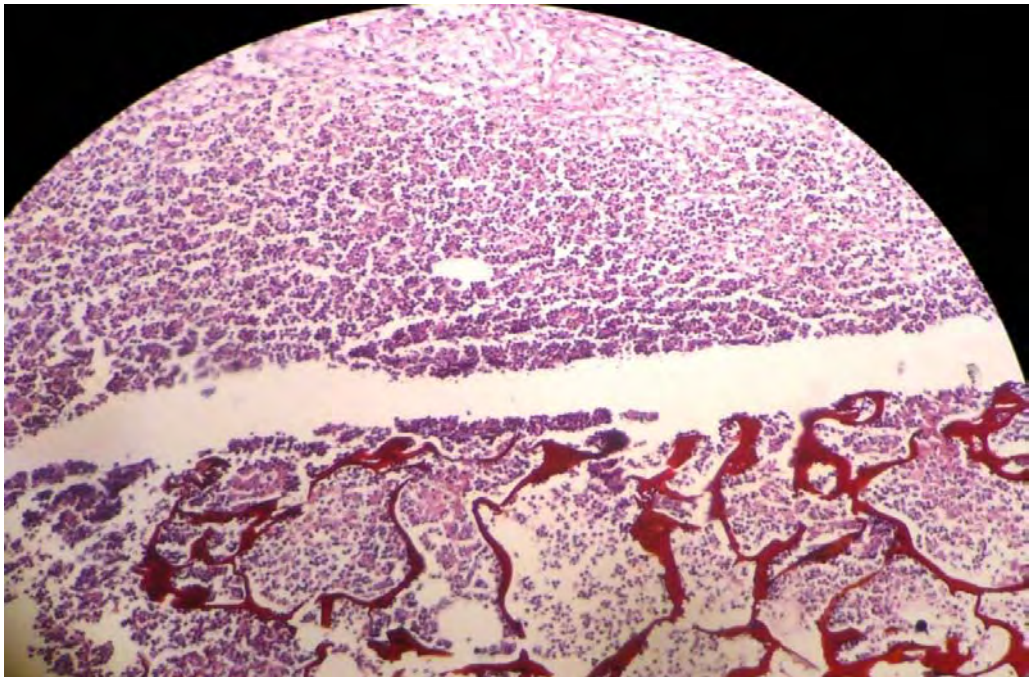
Microfotografía 20x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra A, coloración H/E).



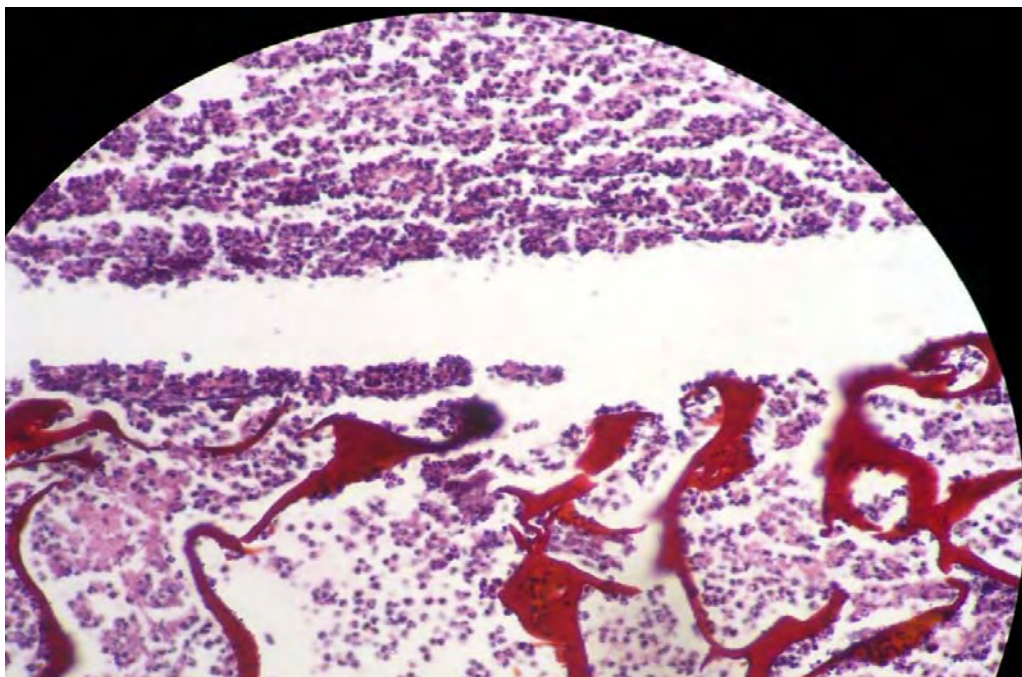
Microfotografía 40x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra A, coloración H/E).



Microfotografía 10x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



Microfotografía 20x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



Microfotografía 40x tomada a los 7 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).

RESULTADOS DE LA LECTURA MICOROSCOPICA (COLORACIÓN H/E)
MUESTRAS DE 21 DÍAS DE IMPLANTACIÓN CON ESPONJAS DE
QUITOSANO NO ENTRECRUZADAS

- A. Inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja, y en algunas zonas fibroblastos ingresando a la esponja, se observa también algunas células gigantes, las paredes de la esponja intactas en su extensión. Además hay neo formación de vasos sanguíneos.
- B. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- C. 10X: Se observa las paredes de la esponja conservada e inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja.
20X: Se observa una pared de fibrosis limitada claramente por la pared de la esponja.
40X: Se observa una fibrosis alrededor de la esponja con abundante fibroblastos además algunos linfocitos y células plasmáticas. .
- D. Ausencia de inflamación.
- E. Inflamación aguda severa rodeando a la esponja, se observa formación de tejido crónico en la periferia.
- F. Inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja, dentro de la esponja se observa polimorfos, leucocitos, también células gigantes, presencia de vasos neo formados.
- G. Inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja, dentro de la esponja se observa polimorfos, leucocitos, también células gigantes, presencia de vasos neo formados.
- H. Inflamación aguda moderada rodeando a la esponja, se observa formación de fibroso en la periferia. Dentro de la esponja se observa abundantes polimorfos y linfocitos.
- I. 10X: Se observa la corona inflamatoria aguda moderada rodeando a la esponja, además del inicio de la formación de tejido fibroso en la periferia.
20X: Las paredes de la esponjas aun permanecen casi integra, se observa unas zonas basófila y otras eosinófilas.

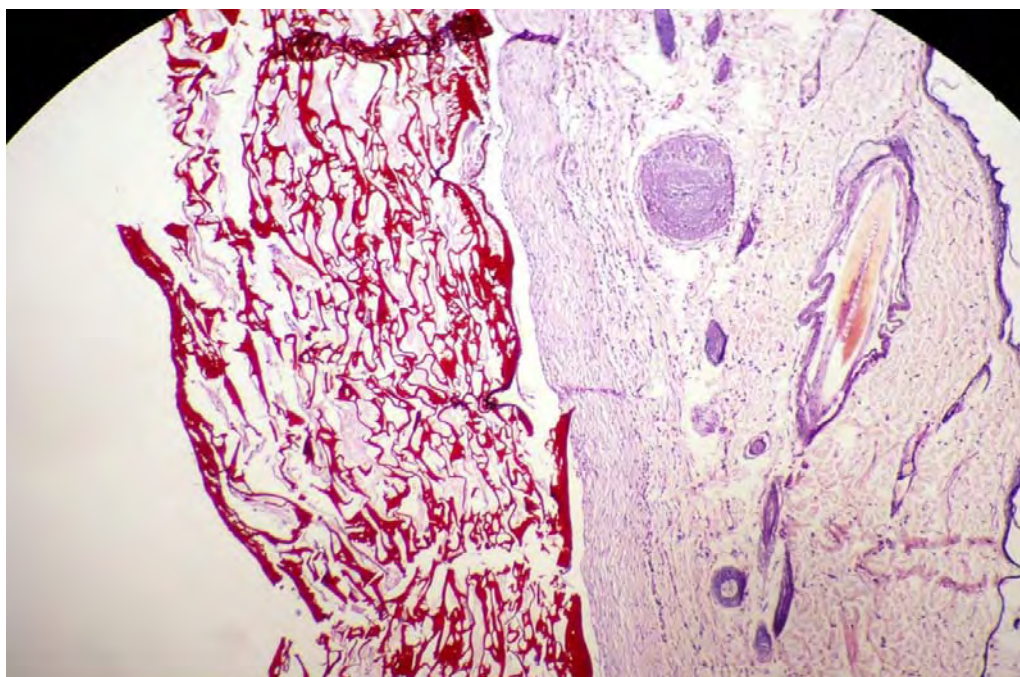
40X: Se observa que en la corona inflamatoria se encuentran polimorfos nucleares y algunos neutrófilos.

J. 10X: Se observa las paredes de la esponja conservada e inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja.

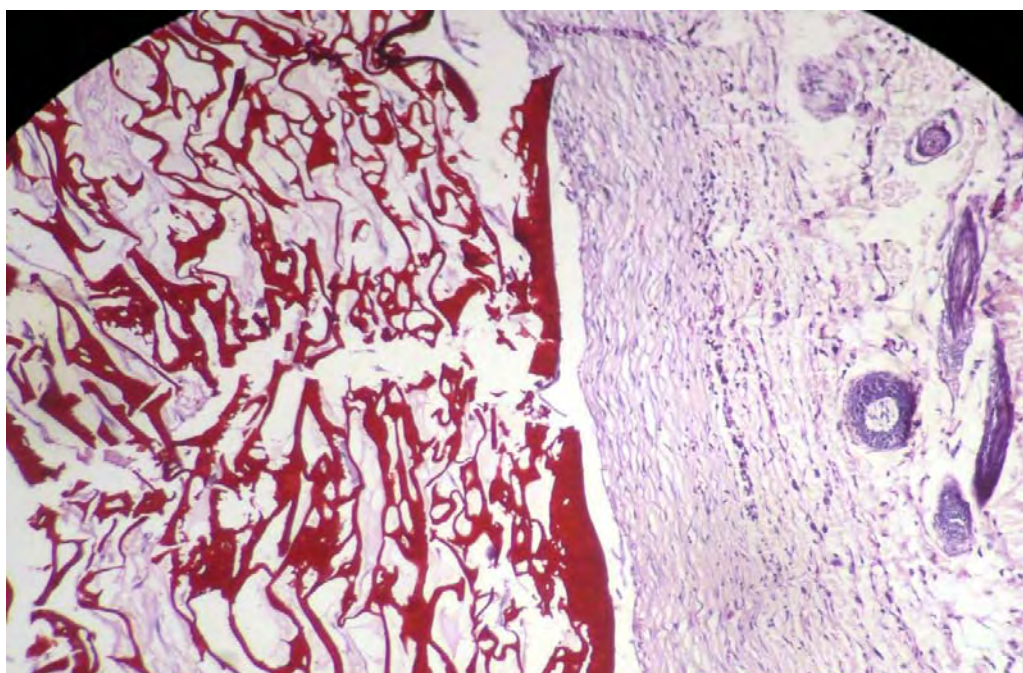
20X: Se observa una pared de fibrosis limitada claramente por la pared de la esponja.

40X: Se observa una fibrosis alrededor de la esponja con abundante fibroblastos además algunos

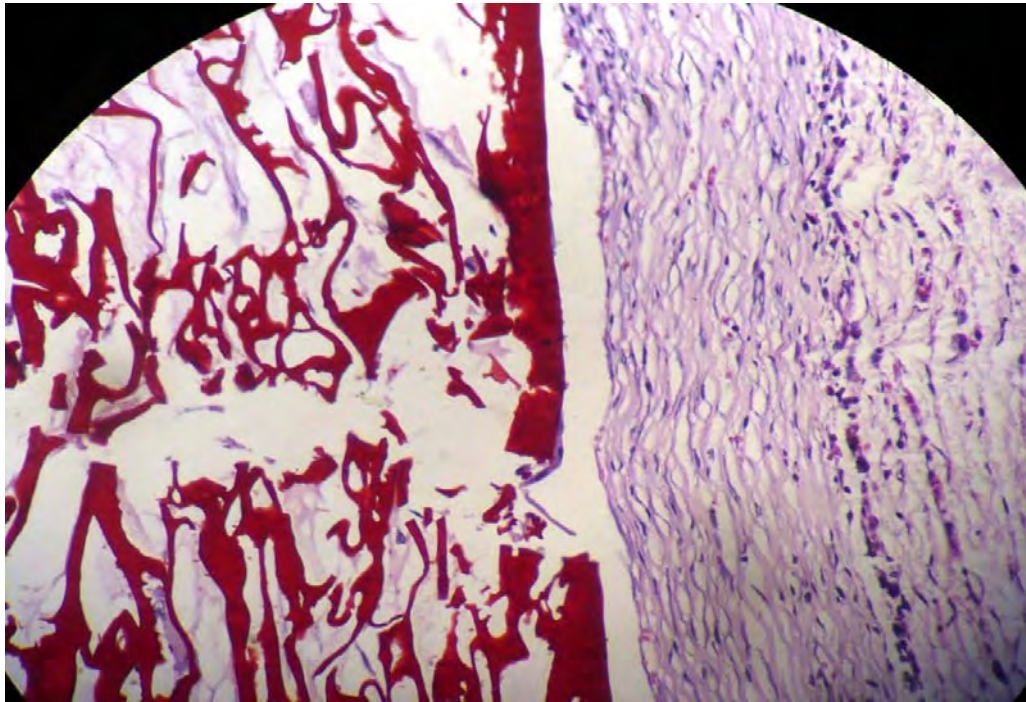
K. Inflamación crónica leve, se observa fibrosis alrededor de la esponja, dentro de la esponja se observa polimorfos, leucocitos, también células gigantes, presencia de vasos neo formados.



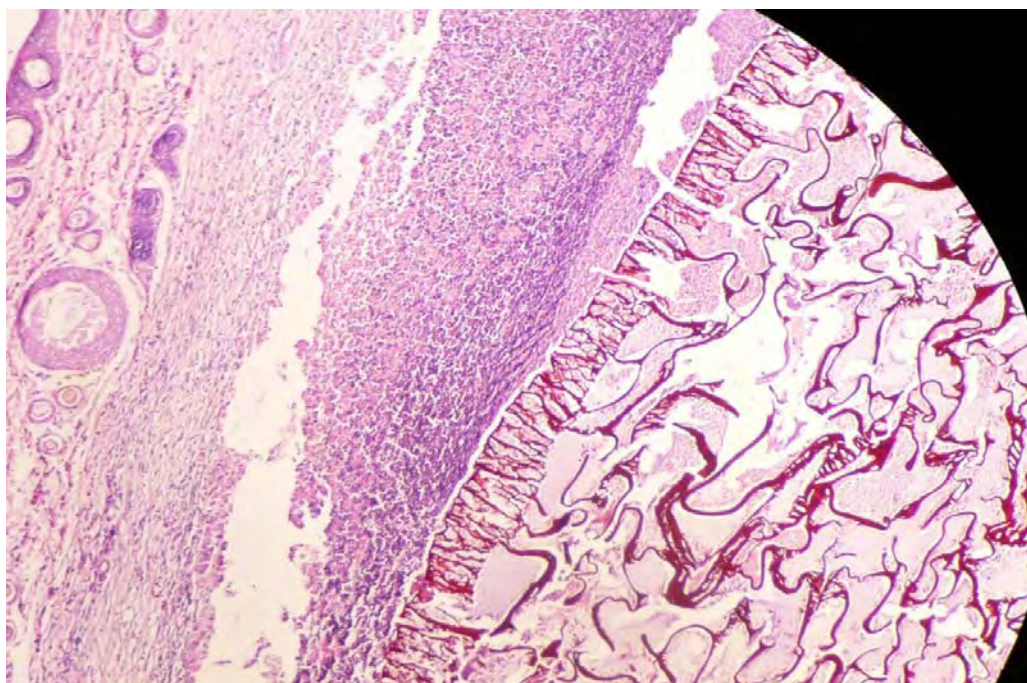
Microfotografía 10x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



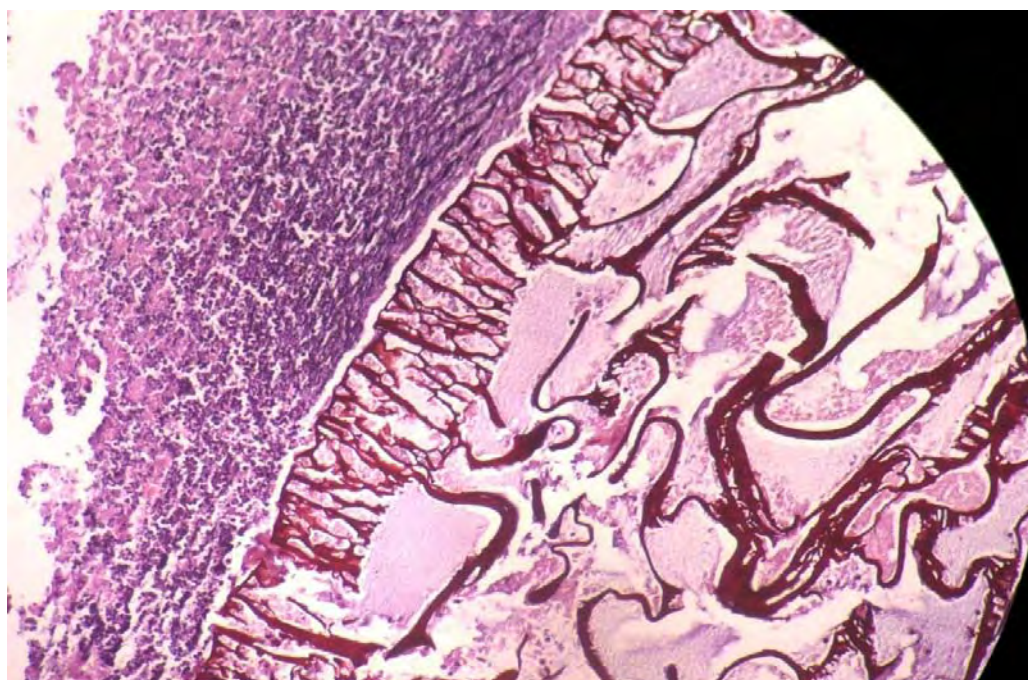
Microfotografía 20x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



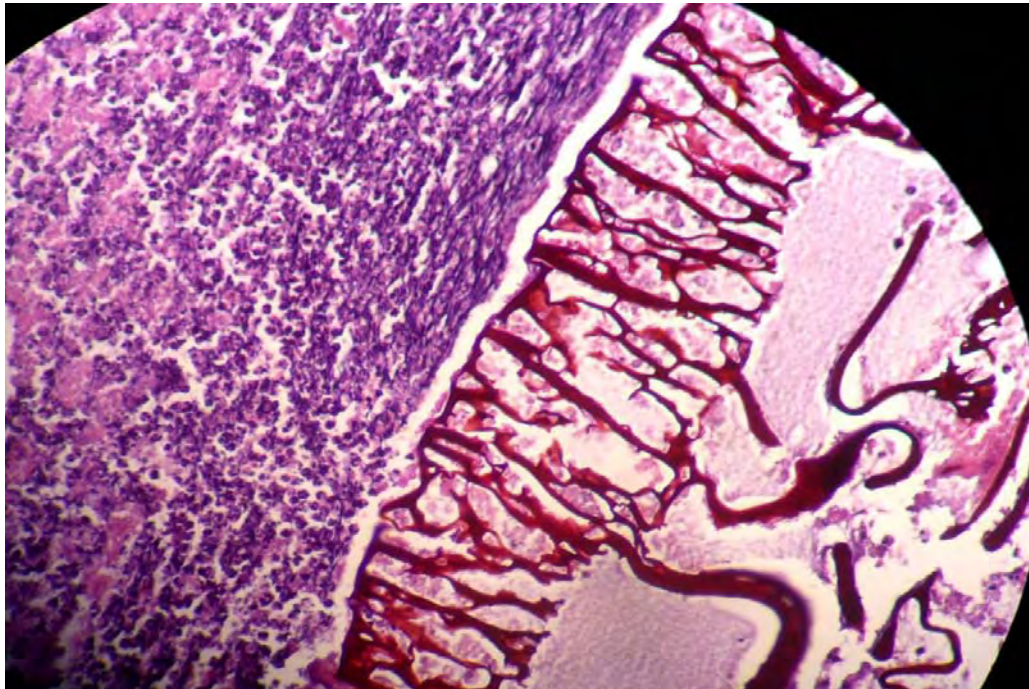
Microfotografía 40x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



Microfotografía 10x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).



Microfotografía 20x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).



Microfotografía 40x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano no entrecruzada (muestra I, coloración H/E).

RESULTADOS DE LA LECTURA MICOROSCOPICA (COLORACIÓN H/E)
MUESTRAS DE 21 DÍAS DE IMPLANTACIÓN CON ESPONJAS DE
QUITOSANO ENTRECRUZADAS

- A. Inflamación aguda severa, presencia de abundantes polimorfos alrededor de la esponjas; dentro de la esponjas se observa neutrófilos, focos de necrosis, u abundantes polimorfos, periféricamente a la corona inflamatoria aguda se observa la formación de la capsula fibrótica.
- B. Inflamación crónica leve, presencia de delgada envoltura de tejido fibroso, se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro del a matriz esponjosa; además la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación, existe también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.
- C. 10X: Se observa la pared de la esponja irregular y una delgada zona de inflamación crónica leve.
20X: Se observa que la esponja de quitosano ha perdido su estructura inicial, la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación; además que las células han ingresado dentro de la esponja.
40X: Se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro del a matriz esponjosa, existen también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.
- D. Inflamación crónica leve, presencia de delgada envoltura de tejido fibroso, se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro del a matriz esponjosa; además la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación, existe también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.
- E. Inflamación crónica leve, presencia de delgada envoltura de tejido fibroso, se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro del a matriz esponjosa; además la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas extensas de evidente degradación, existe también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.

F. 10X: Se observa la pared de la esponja irregular y una delgada zona de inflamación crónica leve.

20X: Se observa que la esponja de quitosano ha perdido su estructura inicial, la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación; además que las células han ingresado dentro de la esponja.

40X: Se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro de la matriz esponjosa, existen también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.

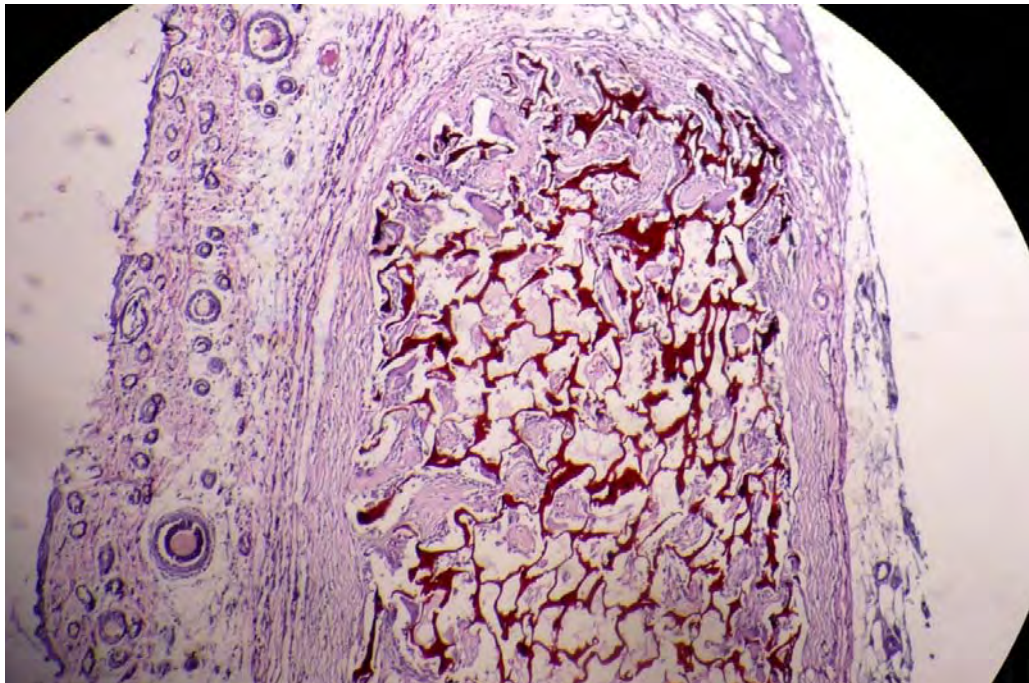
G. Ausencia de inflamación.

H. Ausencia de inflamación.

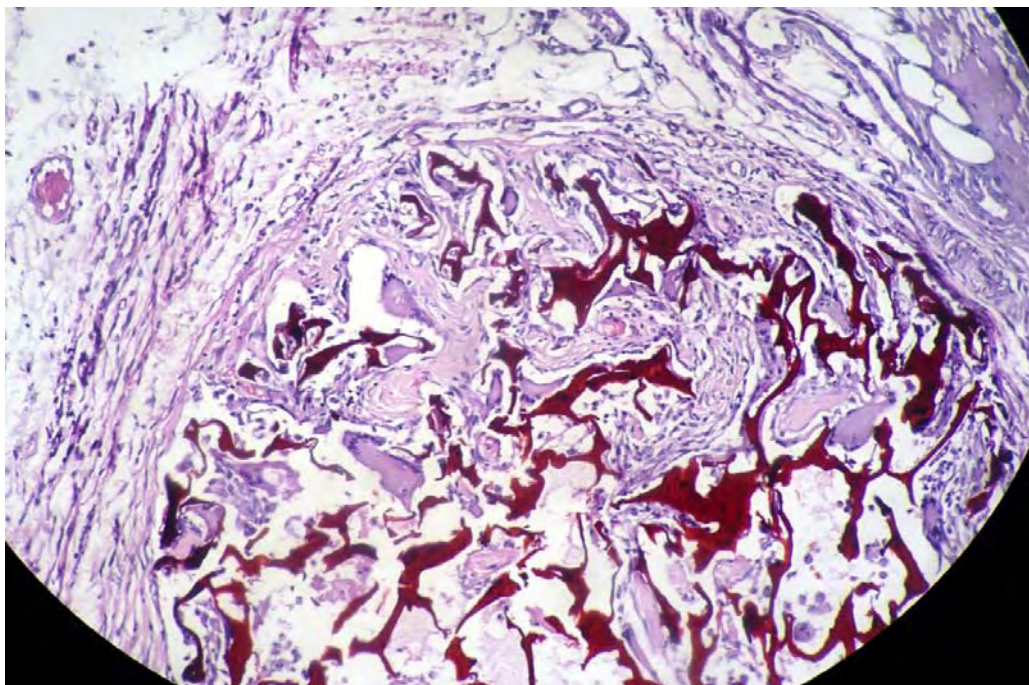
I. Ausencia de inflamación.

J. Inflamación crónica leve, presencia de delgada envoltura de tejido fibroso, se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro de la matriz esponjosa; además la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación, existe también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.

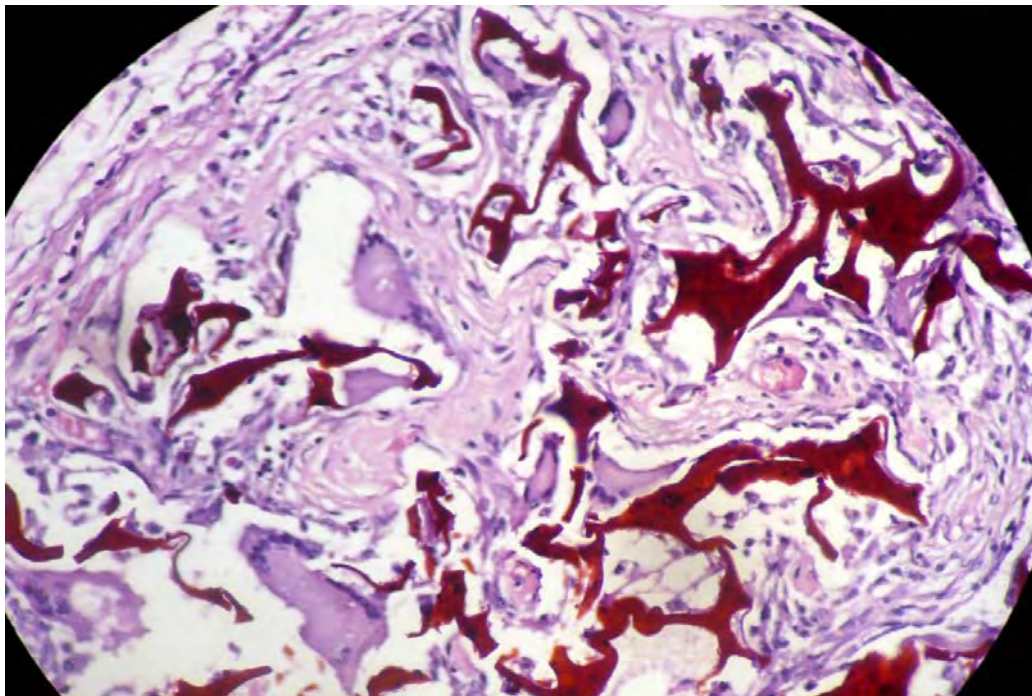
K. Inflamación crónica leve, presencia de delgada envoltura de tejido fibroso, se observa abundantes fibroblastos y fibras de colágeno introduciéndose dentro de la matriz esponjosa; además la superficie de la esponjas se muestra irregular y con zonas de evidente degradación, existe también vasos neo formados, y células gigantes en aparente fagocitosis.



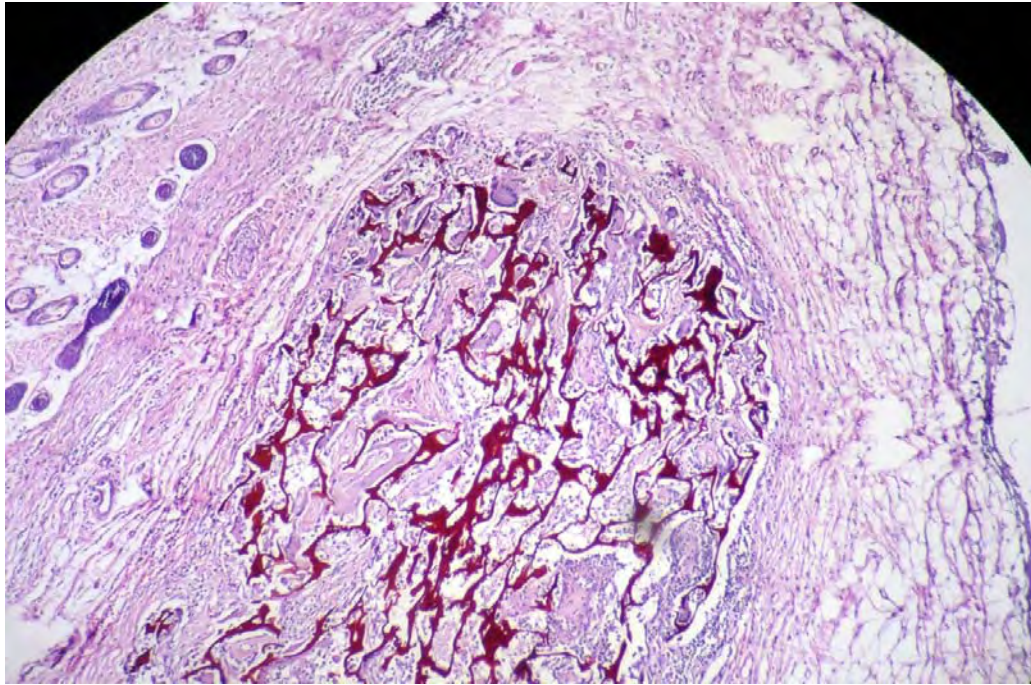
Microfotografía 10x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



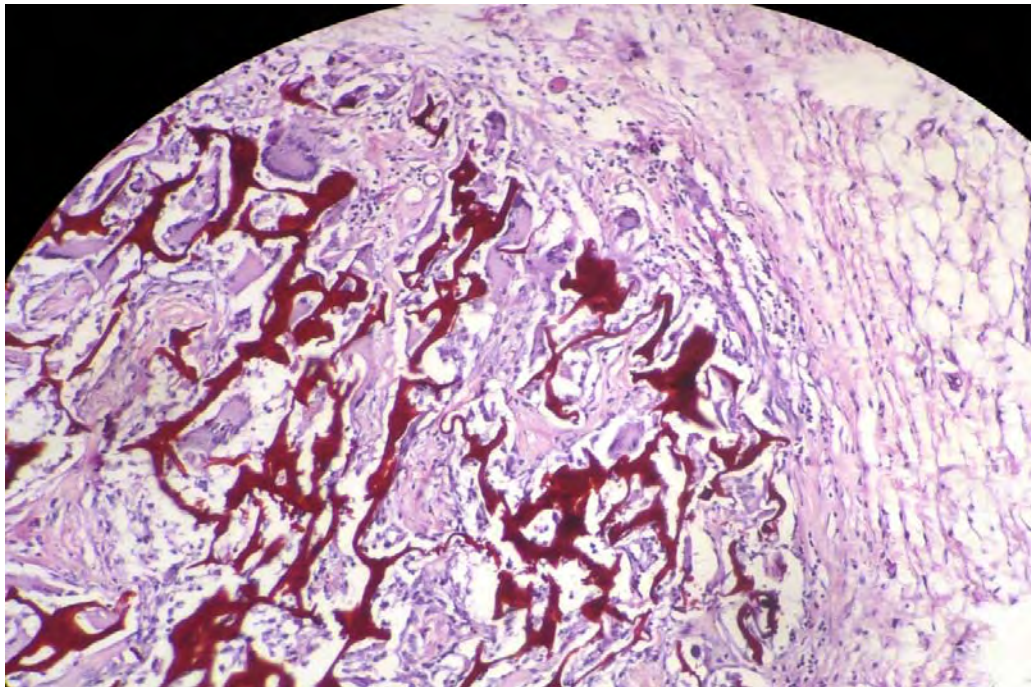
Microfotografía 20x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



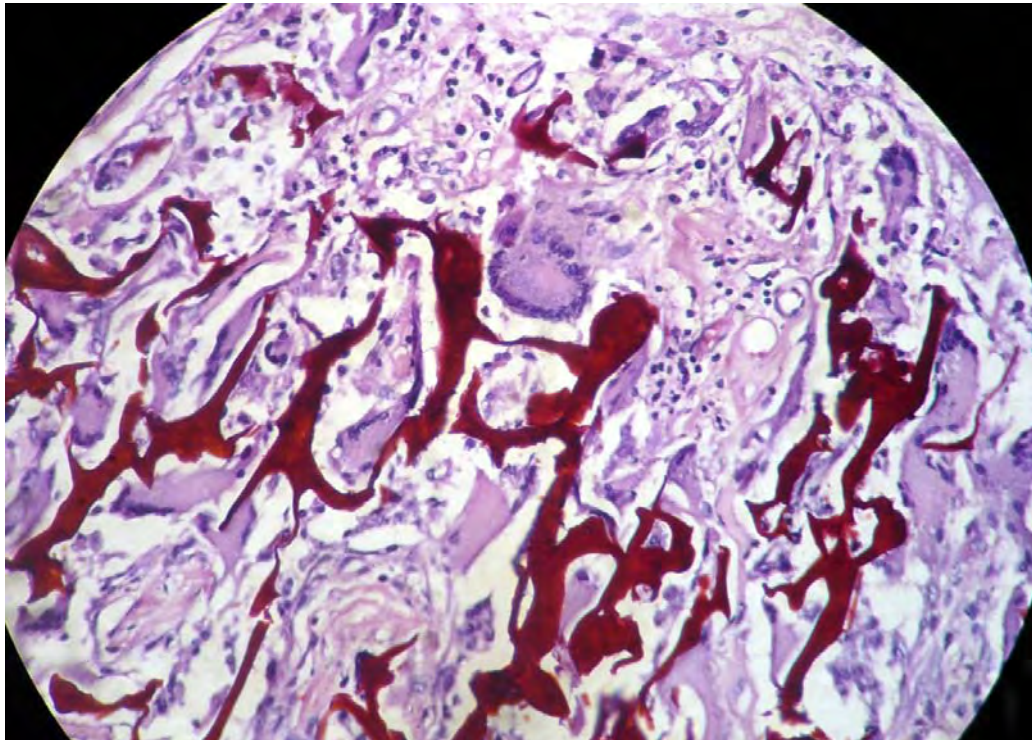
Microfotografía 40x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra C, coloración H/E).



Microfotografía 10x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra F, coloración H/E).

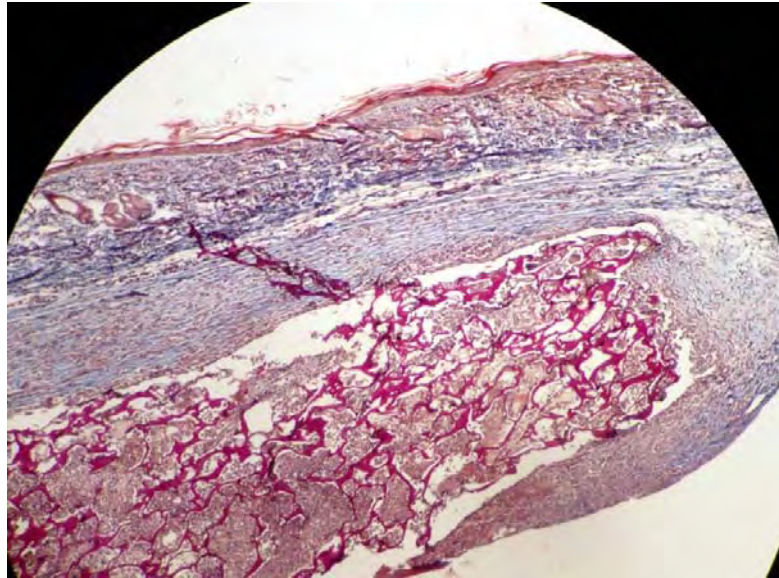


Microfotografía 20x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra F, coloración H/E).

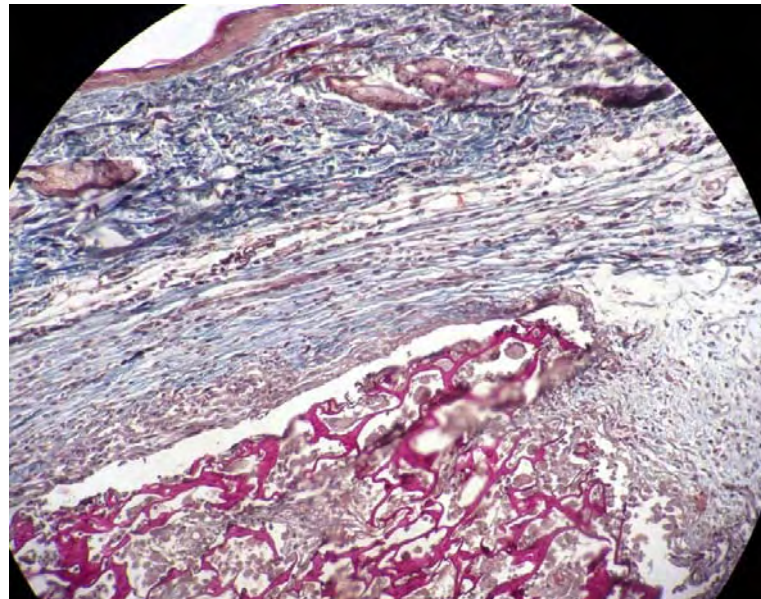


Microfotografía 40x tomada a los 21 días de implantación con esponjas de quitosano entrecruzada (muestra F, coloración H/E).

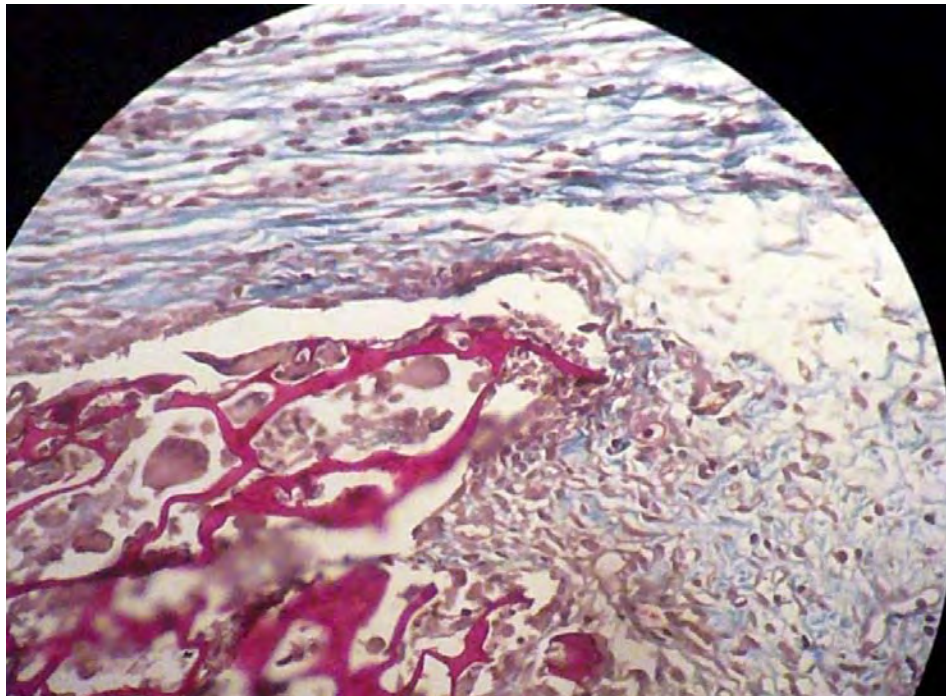
COLORACIÓN MASSON: MUESTRA J
7 días de implantación esponjas de quitosano entrecruzadas



10X: Se observa una zona tincionada de azul periféricamente a la esponjas de quitosano.

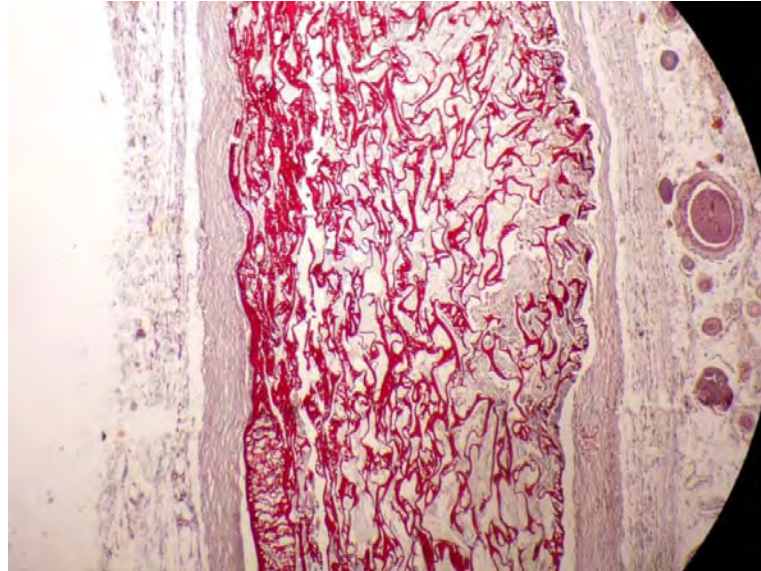


20X: Se observa que la zona azul esta formada por fibras azules que rodean la esponja, las paredes de la esponja no están integras.

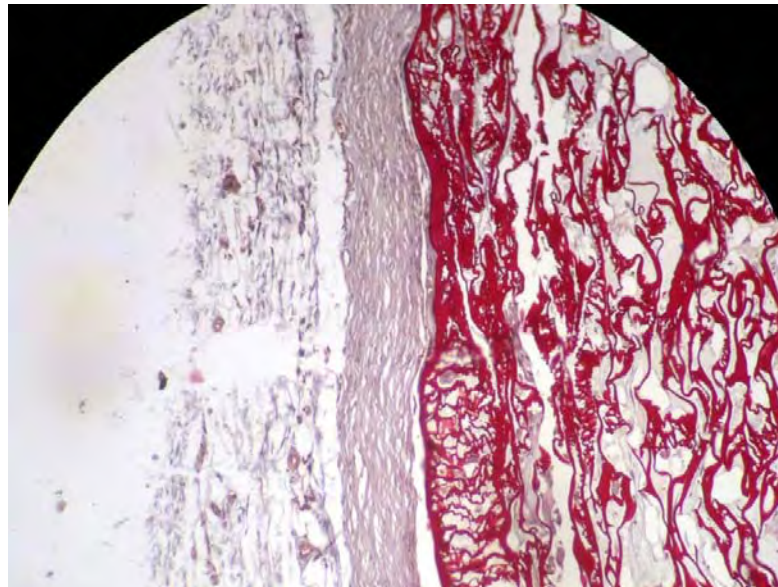


40X: Se observa que entre las fibras azules se encuentran fibroblastos por lo tanto esta fibras son fibras de colágeno, que inclusive en algunas zonas se introducen dentro de las trabéculas.

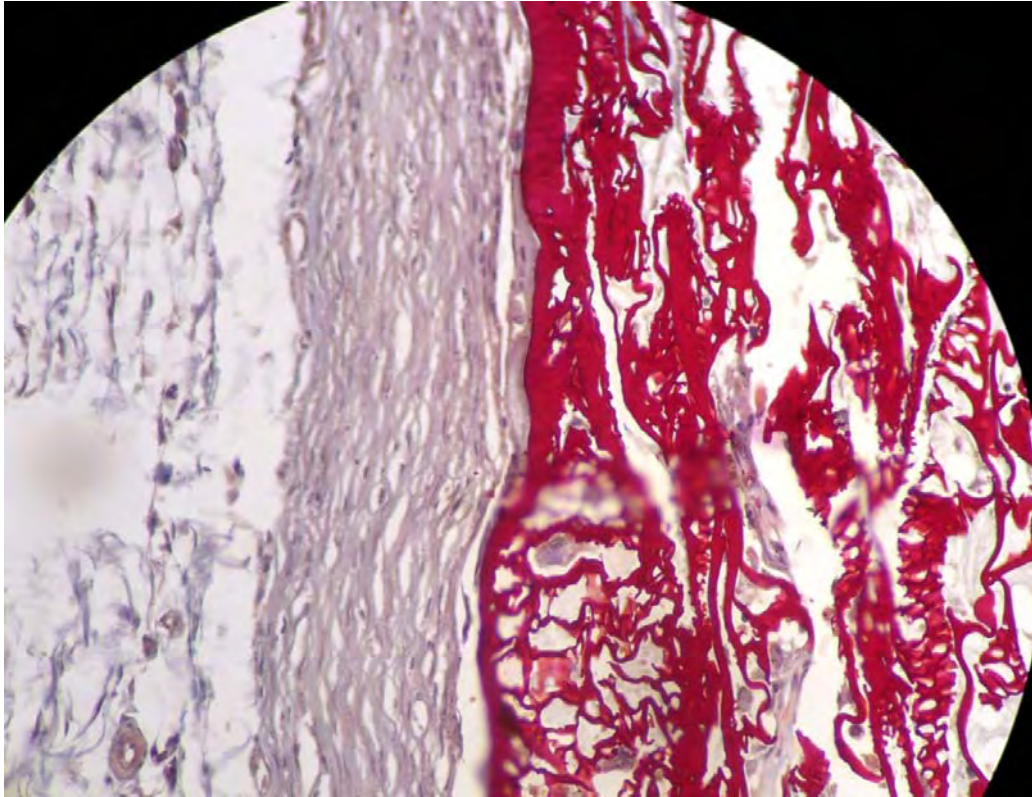
COLORACIÓN MASSON: MUESTRA J
21 días de implantación esponjas de quitosano no entrecruzadas



10X: Se observa una zona tincionada de azul periféricamente a la esponjas de quitosano.

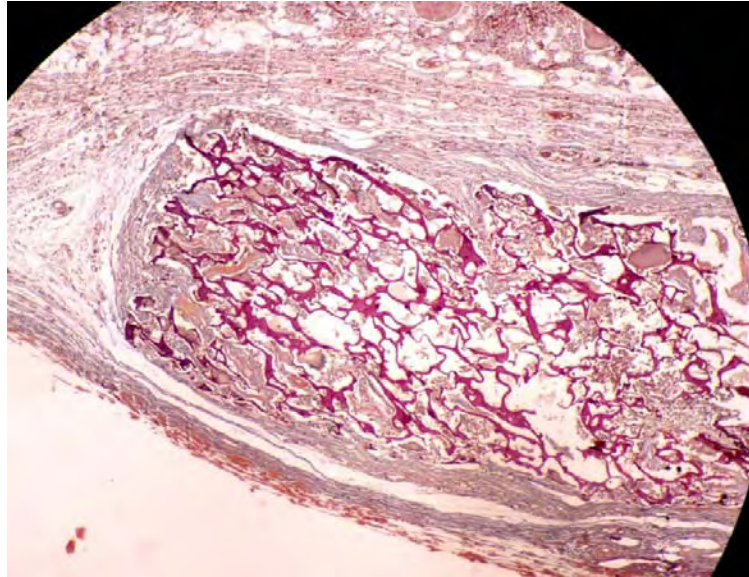


20X: Se observa que la zona azul esta formada por fibras azules que rodean la esponja, la pared de la esponja esta integra.

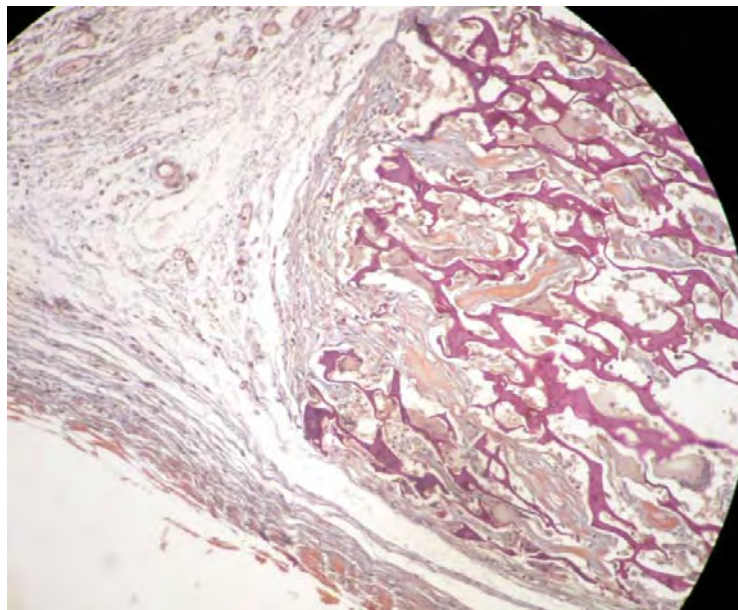


40X: Se observa que entre las fibras azules se encuentran fibroblastos por lo tanto esta fibras son fibras de colágeno, pero no penetran la pared de la esponja

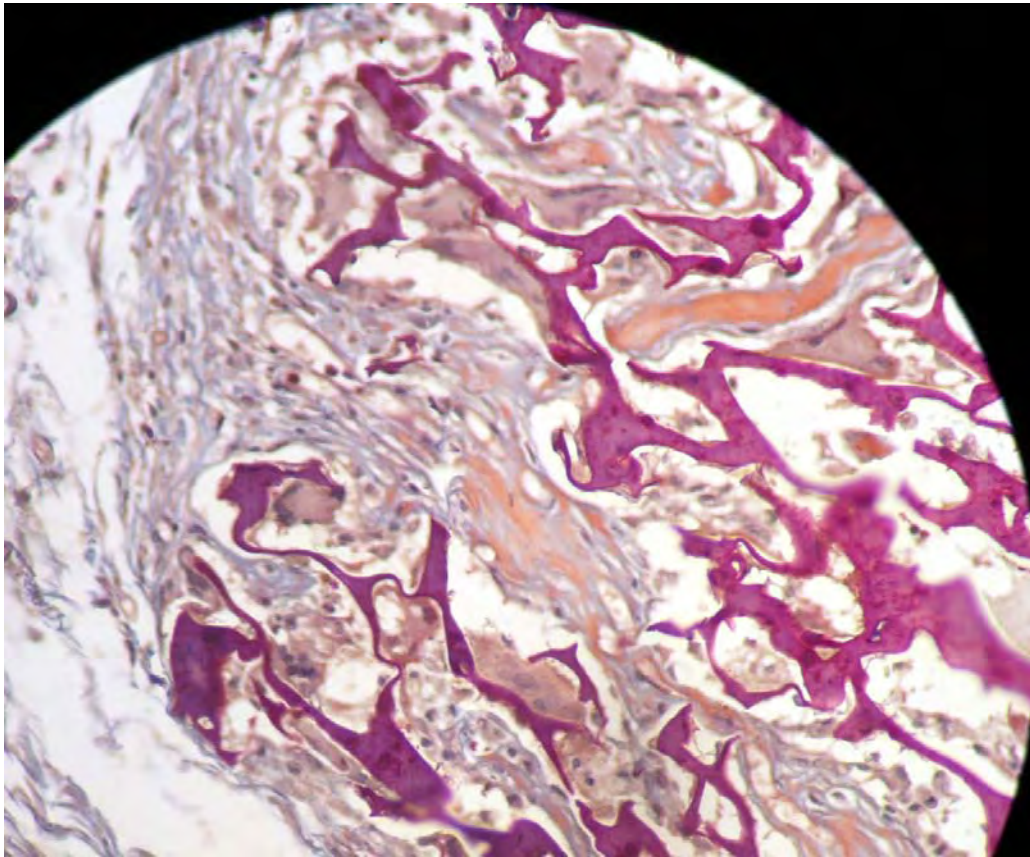
COLORACIÓN MASSON: MUESTRA C
21 días de implantación esponjas de quitosano entrecruzadas



10X: Se observa una zona delgada tincionada de azul periféricamente a la esponjas de quitosano, además en algunas zonas aparente mente penetra la pared de la esponja.



20X: Se observa que la zona azul esta formada por fibras azules que rodean la esponja, las paredes de la esponja no están enteras.



40X: Se observa que entre las fibras azules se encuentran fibroblastos por lo tanto esta fibras son fibras de colágeno, que inclusive en algunas zonas se introducen dentro de las trabéculas. Además se observa unas áreas de color naranja que seria la matriz del colágeno.